

明 細 書

発明の名称：抗GDF15抗体

技術分野

[0001] 本出願は、国際出願番号PCT/JP2019/047956について優先権を主張するものであり、ここに参照することによって、その全体が本明細書中へ組み込まれるものとする。

本開示は、抗GDF15抗体およびその用途に関する。

背景技術

[0002] 悪液質は、慢性疾患に伴う、体重減少・筋力低下を特徴とする複合的代謝性疾患である。なかでも、がん悪液質は多くの進行がん患者にみられ、患者の予後やQOLを悪化させるため、積極的な治療が求められる。しかしながら、悪液質の病態は複雑であり、発生機序に不明な点も多く、現在のところ効果的な治療薬は存在しない。

[0003] GDF15 (Growth Differentiation Factor 15) は、TGF- β スーパーファミリーの分泌タンパク質であり、がんや糖尿病など各種疾患への関与が報告されている。血中GDF15濃度に関する臨床研究の報告は多数存在し、例えば、がん患者における血中およびがん組織のGDF15レベルが高いこと、がん患者の血中GDF15レベルと予後が相関することが報告されている。また、GDF15は、脳の摂食中枢に作用して食欲不振を誘発し、悪液質の発症に関与することが知られている。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本開示は、GDF15に関連する疾患または症状の処置に有用な抗GDF15抗体を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本開示は、ある態様において、DHCPLGPGRCCRLH（配列番号3）のアミノ酸配列を含むhGDF15のエピトープに結合する抗hGDF15抗体を提供する。

[0006] 本開示は、さらなる態様において、

配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む抗hGDF15抗体を提供する。

[0007] 本開示は、さらなる実施形態において、

配列番号18のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号19のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号20のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個の

アミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号21のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号22のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号23のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む抗hGDF15抗体を提供する。

[0008] 本開示は、さらなる態様において、

配列番号8のアミノ酸配列と80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号8のアミノ酸配列もしくは配列番号8のアミノ酸配列において1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、または1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号9のアミノ酸配列と80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号9のアミノ酸配列もしくは配列番号9のアミノ酸配列において1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、または1～3個のアミノ酸残基改変されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む抗hGDF15抗体を提供する。

[0009] 本開示は、さらなる態様において、

配列番号133のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号133のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたア

ミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む抗hGDF15抗体を提供する。

[0010] 本開示は、さらなる態様において、

配列番号 1 3 7 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 3 8 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 3 9 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 4 0 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 4 1 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 4 2 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む抗hGDF15抗体を提供する。

[0011] 本開示は、さらなる態様において、

配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 1 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 1 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む抗hGDF15抗体を提供する。

[0012] 本開示は、さらなる態様において、

配列番号 1 4 3 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個

のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 4 4 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 4 5 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 4 6 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 4 7 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 4 8 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む抗hGDF15抗体を提供する。

[0013] 本開示は、さらなる態様において、hGDF15との結合について前記いずれかの抗体と競合する抗hGDF15抗体を提供する。

[0014] 本開示は、さらなる態様において、前記いずれかの抗体をコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、または前記ポリヌクレオチドを含む形質転換細胞を提供する。

[0015] 本開示は、さらなる態様において、前記いずれかの抗体を含む医薬組成物を提供する。

発明の効果

[0016] 本開示の抗hGDF15抗体は、既存の抗hGDF15抗体とは異なるエピトープを認識し、GDF15に関連する疾患または症状の処置に有用である。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]図 1 は、4種類の抗hGDF15モノクローナル抗体（HuMAB2、MAB17、Hu01G06-127、MAB957）を用いた競合試験の結果を示す。

[図2A]図 2 A は、HuMAB2のFabとhGDF15との共結晶の立体構造解析の結果を示

す。

[図2B]図 2 B は、HuMAB2のFabとhGDF15との共結晶の立体構造解析によるエピトープおよびパラトープの解析結果を示す。

[図3]図 3 は、HuMAB2のFabとhGDF15の結合の立体構造解析結果である。hGDF15はホモ2量体を形成しており、HuMAB2が結合するアミノ酸のうち、hGDF15単量体の1つ (Monomer1) に存在するアミノ酸を下線で、もう1つの単量体 (Monomer2) に存在するアミノ酸 (71D72T) を二重下線で示す。結合に重要なアミノ酸を太字で示し、特に結合の強いアミノ酸を矢印で示す。

[図4]図 4 は、hGDF15またはDHCPLGPGGCCRLH (配列番号 3) の合成ペプチドとHuMAB2との結合試験の結果を示す。

[図5A]図 5 A は、HuMAB2変異体とhGDF15との結合 (H鎖改変抗体 1/2) を示す。

[図5B]図 5 B は、HuMAB2変異体とhGDF15との結合 (H鎖改変抗体 2/2) を示す。

[図5C]図 5 C は、HuMAB2変異体とhGDF15との結合 (L鎖改変抗体 1/2) を示す。

[図5D]図 5 D は、HuMAB2変異体とhGDF15との結合 (L鎖改変抗体 2/2) を示す。

[図6]図 6 は、HuMAB2およびMAB17による血中hGDF15の捕捉を示す。

[図7]図 7 は、担癌マウスモデルの血中非結合hGDF15濃度に対する抗hGDF15抗体の効果を示す。

[図8]図 8 は、担癌マウスモデルの体重減少、累積摂餌量、および血中非結合hGDF15濃度に対するHuMAB2の効果を示す。

[図9]図 9 は、担癌マウスモデルの活動性 (概日リズム) に対するHuMAB2の効果を示す。

[図10]図 10 は、HuMAB2変異体とhGDF15との結合を示す。

[図11]図 11 は、変異を有するH鎖 (H49R、H49D、H48S、H71Y、H83R、またはH120F) およびL鎖 (L48K、L112D、L72F、またはL24H) から構成されるHuMAB2

変異体とhGDF15との結合を示す。

[図12]図12は、GDF15およびGFRALの複合体形成に対する抗GDF15抗体の阻害活性の評価の模式図を示す。

[図13]図13は、GDF15、GFRALおよびRETの複合体形成に対するHuMAB2の阻害活性の評価の模式図およびその評価結果を示す。

[図14]図14は、担癌マウスモデルの体重減少、累積摂餌量、および血中非結合hGDF15濃度に対するMAB1の効果を示す。

発明を実施するための形態

[0018] 特に具体的な定めのない限り、本明細書で使用される用語は、有機化学、医学、薬学、分子生物学、微生物学等の分野における当業者に一般に理解されるとおりの意味を有する。以下にいくつかの本明細書で使用される用語についての定義を記載するが、これらの定義は、本明細書において、一般的な理解に優先する。

[0019] 本開示では、数値が「約」の用語を伴う場合、その値の±10%の範囲を含むことを意図する。例えば、「約20」は、「18～22」を含むものとする。数値の範囲は、両端点の間の全ての数値および両端点の数値を含む。範囲に関する「約」は、その範囲の両端点に適用される。従って、例えば、「約20～30」は、「18～33」を含むものとする。

[0020] 本明細書において、アミノ酸残基は以下の略号で表される。

AlaまたはA：アラニン

ArgまたはR：アルギニン

AsnまたはN：アスパラギン

AspまたはD：アスパラギン酸

CysまたはC：システイン

GlnまたはQ：グルタミン

GluまたはE：グルタミン酸

GlyまたはG：グリシン

HisまたはH：ヒスチジン

IleまたはI：イソロイシン

LeuまたはL：ロイシン

LysまたはK：リジン

MetまたはM：メチオニン

PheまたはF：フェニルアラニン

ProまたはP：プロリン

SerまたはS：セリン

ThrまたはT：スレオニン

TrpまたはW：トリプトファン

TyrまたはY：チロシン

ValまたはV：バリン

本明細書において、あるアミノ酸配列におけるアミノ酸残基は、その位置を表す数字とアミノ酸残基を表す略号とで（例えば、13番目のアルギニン残基を「13R」として）示されることがある。

[0021] GDF15 (Growth Differentiation Factor 15) は、MIC-1、PLAB、PDF、NAG-1としても知られる、TGF- β スーパーファミリーの分泌タンパク質である。GDF15遺伝子は、前駆体であるプロGDF15を発現し、このプロGDF15が膜型メタロエンドプロテアーゼにより切断され、成熟GDF15が生成される。GDF15は可溶性であり、二量体を形成してその受容体であるGFRALに認識されと考えられている。特に記載する場合を除き、本明細書におけるGDF15なる用語は、成熟GDF15を意味する。

[0022] 本明細書において、GDF15なる用語は、あらゆる生物種のGDF15を含む意味で用いられる。ある実施形態において、GDF15はヒトGDF15 (hGDF15) である。プロhGDF15の代表的アミノ酸配列を配列番号1に示す。プロhGDF15は、29アミノ酸からなるシグナルペプチド（下線）、167アミノ酸からなるプロペプチド、および112アミノ酸からなる成熟ペプチド（二重下線、hGDF15）の308アミノ酸からなるポリペプチドである。hGDF15の代表的アミノ酸配列を配列番号2に示すが、本開示におけるhGDF15は、配列番号2のアミノ酸配列を含

むものに限定されない。

プロhGDF15（配列番号1）

MPGQELRTVN GSQMLLVLLV LSWLPHGGAL SLAEASRASF PGPSELHSED
SRFRELKRY EDLLTRLRAN QSWEDSNTDL VPAPAVRILT PEVRLGSGGH
LHLRISRAAL PEGLPASRL HRALFRLSPT ASRSWDVTRP LRRQLSLARP
QAPALHLRLS PPPSQSDQLL AESSARPQL ELHLRPQAAR GRRRARARNG
DHCPLGPGR CRLHTVRASL EDLGWADWVL SPREVQVTC IGACPSQFRA
ANMHAQIKTS LHRLKPDTPV APCCVPASYN PMVLIQKTDG GVSLQTYDDL
LAKDCHCI

hGDF15（配列番号2）

ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTCIGACPS
QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTPVAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTVSLQT
YDDLAKDCH CI

- [0023] 本明細書における「抗体」なる用語は、抗原に対する結合性を有する、免疫グロブリンまたはその一部を含む分子を意味し、天然の免疫グロブリンの形態の分子のみならず、キメラ抗体、ヒト化抗体、多重特異性抗体、抗体断片など、種々の構造の分子を含む意味で用いられる。本明細書における「モノクローナル」なる用語は、それぞれ異なるエピトープに対する複数種類の抗体の混合物である「ポリクローナル抗体」と区別するために用いられ、単一種類の抗体の集団から得られることを意味する。それゆえ、「モノクローナル抗体」なる用語は、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、多重特異性抗体、および抗体断片を意味する。抗体断片は、免疫グロブリンの一部を構成要素として含む分子を意味し、例えば、限定はされないが、抗体の重鎖および軽鎖可変領域（V_HおよびV_L）、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、disulphide-linked FV (sdFv)、Single-Chain FV (scFV) およびこれらの重合体が

挙げられる。抗体の種は特に限定されず、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒト由来の抗体が挙げられる。

[0024] 本明細書において、「単離された」なる用語は、ある生物学的分子（例えば、抗体またはポリヌクレオチド）が、天然の環境における他の成分から実質的に分離されていることを意味する。

[0025] 抗体のイムノグロブリンクラスは、重鎖定常領域に基づき決定される。イムノグロブリンクラスとしては、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMが挙げられ、これらに対応する重鎖はそれぞれ、 α 鎖、 δ 鎖、 ϵ 鎖、 γ 鎖、および μ 鎖と呼ばれる。イムノグロブリンクラスを、さらにサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2に分類することができる。本明細書における抗体のイムノグロブリンクラスおよびサブクラスは、特に限定はされない。ある実施形態において、イムノグロブリンクラスは、IgGである。抗体の軽鎖は、その定常領域に基づき κ 鎖および λ 鎖に分けることができるが、本明細書における抗体は、 κ 鎖および λ 鎖のいずれを有していてもよい。

[0026] 抗体の可変領域は、通常、4つのフレームワーク領域（framework region）（FRとも記載する）には含まれた3つの相補性決定領域（complementarity determining region）（CDRとも記載する）で構成される。FRおよびCDRは一般に、軽鎖および重鎖とも、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順で存在する。抗体の可変領域やCDRを定義する方法は複数報告されており、例えば、Kabatの定義（Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991）、Chothiaの定義（Chothia et al., J. Mol. Biol., 1987; 196: 901-917）、AbMの定義（Martin et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1989; 86: 9268-9272）、Contactの定義（MacCallum et al., J. Mol. Biol. 1996; 262: 732-745）、およびIMGTの定義（Lefranc et al., Dev Comp Immunol. 2003; 27(1): 55-77）などである。本明細書においては、特に記載する場合を除き、Kabatの定義を用いる。

- [0027] 本明細書において、抗hGDF15抗体とは、所望の効果の発揮に十分な親和性でhGDF15に結合する抗体を意味する。本開示の抗hGDF15抗体は、hGDF15またはその一部を免疫原として用いて、一般的な方法により取得することができる。免疫原は、通常のペプチド合成法により、例えば遺伝子工学的手法または化学合成により、作製することができる。あるいは、本開示の抗体は、遺伝子工学的手法を用いて抗体遺伝子を含む発現ベクターを作製し、細胞で発現させることによって、得ることができる。
- [0028] ポリクローナル抗体は、「Antibodies: A Laboratory Manual, Lane, H. D. et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989」などに記載の一般的な方法により作製することができる。具体的には、前記の免疫原により、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ等の哺乳動物を免疫することで、作製することができる。
- [0029] モノクローナル抗体は、抗体を産生するハイブリドーマを作製する方法や、遺伝子工学的手法を用いて抗体遺伝子を含む発現ベクターを作製して細胞で発現させる方法など、公知の方法により取得することができる。
- [0030] モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマは、Kohler et al., Nature 256:495, 1975に記載の方法に準じて作製することができる。まず、免疫原を、抗原性を高めるための適当な物質（例えば、キーホールリンペットヘモシアニンやウシ血清アルブミン等）、および必要に応じて免疫賦活剤（フロイントの完全若しくは不完全アジュバント等）とともに混合し、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ等の非ヒト哺乳動物に免疫する。通常、免疫動物は3～10日間隔で複数回免疫され、免疫原であるペプチドは1～100 μ gが投与される。次いで、複数回の免疫を経た免疫動物から免疫担当細胞（免疫動物において抗体産生能を有する細胞）を回収し、自己抗体産生能のないミエローマ細胞（例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物に由来する細胞）と、細胞融合させる。細胞融合には、ポリエチレングリコール法、電気融合法などが用いられる。さらに、融合細胞が有する選択マーカーに基づき細胞融合に成功した細胞を選択し、選択さ

れた細胞が産生する抗体の免疫源に対する反応性を、後述の免疫測定法などにより確認することにより、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られる。モノクローナル抗体は、得られたハイブリドーマをインビトロで培養した培養上清から単離することができる。また、マウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の腹水中等のインビボで培養し、腹水から単離することもできる。

- [0031] モノクローナル抗体は、また、抗体遺伝子を含む発現ベクターを作製し宿主細胞で発現させることにより、得ることができる（P.J.Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY; P.Shepherd and C.Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS; J.W. Goding., Monoclonal Antibodies:principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS）。さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて、目的とする抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれたトランスジェニック動物（例えば、ウシ、ヤギ、ヒツジまたはブタ）を作製し、そのトランスジェニック動物のミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を取得することもできる。
- [0032] 得られたモノクローナル抗体は、当該分野において周知の方法、例えばプロテインAカラムによるクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、硫安塩析法、ゲル濾過、アフィニティクロマトグラフィー等を適宜組み合わせることにより、精製することができる。
- [0033] キメラ抗体は、互いに由来の異なる配列を含む抗体であり、例えば、互いに由来の異なる可変領域と定常領域とを連結した抗体である。ある実施形態において、キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来の抗体の可変領域と、ヒト抗体由来の定常領域から構成される。キメラ抗体は、例えば、ヒト以外の哺乳動物由来の抗体の可変領域をコードするポリヌクレオチドとヒト抗体の定常領域をコードするポリヌクレオチドを連結し、これを発現ベクターに組み込み、この発現ベクターを宿主に導入して発現させることによって、取得することができる。

- [0034] CDRは、実質的に抗体の結合特異性を決定する領域であり、そのアミノ酸配列は多様性に富む。一方、FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも高い相同性を示す。そのため、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を他の抗体に移植することができる。
- [0035] CDR移植の方法は種々知られており、例えば、下記の文献に記載されている：米国特許第7,022,500号明細書、米国特許第6,982,321号明細書、米国特許第6,180,370号明細書、米国特許第6,054,297号明細書、米国特許第5,693,762号明細書、米国特許第5,859,205号、米国特許第5,693,761号、米国特許第5,565,332号明細書、；米国特許第5,585,089号明細書、米国特許第5,530,101号明細書、米国特許第5,225,539号明細書；Jones et al. (1986) Nature 321:522-525；Riechmann et al. (1988) Nature 332: 323-327；Queen, et al. (1989) Proc. Natl. Acad. U. S. A. 86:10029-10033；Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536；Winter (1998) FEBS Lett 430:92-94。
- [0036] ヒト化抗体は、一般に、ヒト以外の動物由来の抗体のCDRと、ヒト抗体由来のFRおよびヒト抗体由来の定常領域とから構成される。ヒト化抗体は、ヒト以外の動物由来の抗体のCDRをヒト抗体に移植することにより得ることができる。ヒト化抗体は種々の方法により作製することができるが、一例として、Overlap Extension PCRが挙げられる (Almagro and Fransson, Front. Biosci., 13:1619-1633 (2008))。本方法では、ヒト以外の動物由来の抗体（例えばマウス抗体）のCDRとヒト抗体のFRとの末端にオーバーラップする部分を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行い、ヒト以外の動物由来の抗体のCDRとヒト抗体のFRとが連結されたポリヌクレオチドを合成する。次いで、得られたポリヌクレオチドをヒト抗体の定常領域をコードするポリヌクレオチドと連結し、発現ベクターに組み込んで、この発現ベクターを宿主に導入して発現させることにより、ヒト化抗体を取得することができる。
- [0037] FRの配列は、例えば、生殖細胞系列の抗体遺伝子配列を開示するデータベース（例えば、VBase, <https://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>）または参

考文献（例えば、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 1991); Tomlinson, I. M. et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cox, J. P. L. et al. (1994) Eur. J Immunol. 24:827-836)に基づき、決定することができる。FRは、生殖細胞系列の配列と比較して1以上のアミノ酸の変異を含んでいてもよい。好適なFRの選択方法は公知であり、例えば、ベストフィット法 (Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993))により選択されたFRや、ヒト抗体の軽鎖または重鎖可変領域の特定のサブグループのコンセンサス配列に由来するFR (Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); Presta et al. J. Immunol. 151:2623 (1993))を用いることができる。

[0038] ヒト抗体は、例えば、ヒトリンパ球をインビトロで所望の抗原で感作し、次いで、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞と融合させることによって取得することができる（特公平1-59878号公報）。融合パートナーであるヒトミエローマ細胞には、例えばU266などを利用することができる。また、ヒト抗体は、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することによっても取得することができる（Lonberg, Nat. Biotech. 23: 1117-1125, 2005）。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている（Antibody Phage Display: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology 178, 2001）。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択し、選択されたファージの遺伝子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。次いで、この可変領域配列をヒト抗体定常領域の配列とインフレームで連結し、適当な発現ベクターに挿入して、この発現ベクターを宿主に導入して発現させることにより、ヒト抗体を取得することができる。

[0039] 多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に結合する抗体である。多

重特異性抗体としては、二重特異性抗体、三重特異性抗体などが挙げられる。ある実施形態において、多重特異性抗体は、hGDF15と、1以上の他の抗原とに結合する。多重特異性抗体は、例えば、遺伝子工学的手法により、あるいは認識抗原が異なる2つ以上の抗体を結合することにより、作製することができる。

[0040] 抗体断片は、例えば、パパイン、ペプシン等のプロテアーゼにより抗体を消化することにより得ることができる。あるいは、抗体断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入し発現させることで得ることができる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137; Hudson et al., Nat. Med., (2003) 9, 129-134）。

[0041] 前述のように、抗体は、これをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを細胞に導入して発現させることにより、得ることができる。具体的には、抗体をコードする配列がエンハンサーやプロモーターなどの発現制御領域のもとで発現するよう発現ベクターを構築し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換して、抗体を発現させる。

[0042] すなわち、本開示はまた、抗hGDF15抗体をコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、および前記抗体を発現可能なポリヌクレオチドを含む形質転換細胞を提供する。

[0043] 宿主細胞としては、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞などの真核細胞を用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞（例えば、CHO、COS、NIH3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero）、両生類細胞（例えばアフリカツメガエル卵母細胞）、または昆虫細胞（例えば、Sf9、Sf21、Tn5）が挙げられる。真菌細胞としては、酵母（例えば、サッカロ

ミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*))、糸状菌 (例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)) などが挙げられる。また、大腸菌 (*E. coli*) (例えば、JM109、DH5 α 、HB101等)、枯草菌などの原核細胞を宿主細胞として用いることもできる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法により行うことができる。

- [0044] 得られた抗体の抗原への結合は、酵素免疫測定法 (EIA) (ELISAを含む)、放射免疫測定法 (RIA)、化学発光免疫測定法 (CIA)、蛍光免疫測定法 (FIA) などの免疫測定法や、BIAcore (登録商標) 表面プラズモン共鳴アッセイなどにより確認することができる。抗体の抗原への結合は、競合アッセイにより確認することもできる。例えば、得られた抗体が、hGDF15への結合が確認されている抗hGDF15抗体と競合するか否かを調べることにより、確認することができる。
- [0045] 本明細書において、所定の抗hGDF15抗体 (すなわち、参照抗体) と競合する抗体とは、実施例に記載する条件で測定した場合に、参照抗体のhGDF15に対する結合を有意に減少させる抗体を意味する。ある実施形態において、本開示の抗体は、参照抗体のhGDF15に対する結合を10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%以上減少させる。
- [0046] ある実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、DHCPLGPGRCCRLH (配列番号3) のアミノ酸配列を含むhGDF15のエピトープに結合する。配列番号3のアミノ酸配列は、配列番号2の5～18番目のアミノ酸残基に相当する。DHCPLGPGRCCRLH (配列番号3) のアミノ酸配列を含むエピトープに結合するか否かは、hGDF15との結合について、配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体と競合するか否かを調べることによって、確認することができる。
- [0047] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、hGDF15との結合に

ついて所定の抗hGDF15抗体と競合する。ある実施形態において、本開示の抗体は、hGDF15との結合について、配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体と競合する。

[0048] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、

配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域；

配列番号133のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域；または

配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR1、また

は前記CDR1のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号136のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号136のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3を含む。

本実施形態において、CDRは、如何なる方法により特定されてもよい。所定の重鎖または軽鎖可変領域に含まれるCDRとは、前記所定の重鎖または軽鎖可変領域からいずれかの方法により特定されたアミノ酸配列からなるCDRを意味し、当該CDRを含む重鎖または軽鎖可変領域は、前記所定の重鎖または軽鎖可変領域とCDR以外の配列は異なってよい。当業者は、種々の条件を考慮して、好適な方法によりCDRを特定することができる。ある実施形態において、CDRは、Kabat、Chothia、AbM、Contact、およびIMGTから選択されるいずれかの定義により特定される。

[0049] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、

配列番号18のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号19のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号20のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号21のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号22のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域
を含む。

- [0050] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、
配列番号 18、38～44、および 149～150 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19、45～48、52～66、および 151～153 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20、49、50 および 67～80 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21、81～89、100～104、および 154 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22、90、106～115、および 155～157 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23、91～99、および 118～132 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域
を含む。

- [0051] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、
配列番号 18、38～42、および 149～150 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19、46～48、52～66、および 151～152 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20、71、73、77、および 79 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 21、81～83、85～89、100～104、および 154 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 22、90、106、108～111、113～115、および 155～157 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 23、93、95～99、121、122、124、125、131、および 132 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む。

[0052] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、下記 (1)～(3) から選択されるいずれかの重鎖可変領域、および下記 (4)～(6) から選択されるいずれかの軽鎖可変領域を含む：

(1) 配列番号 18、38～44、および 149～150 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む重鎖可変領域；

(2) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 19、45～48、52～66、および 151～153 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む重鎖可変領域；

(3) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 20、49、50 および 67～80 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3

を含む重鎖可変領域；

(4) 配列番号 21、81～89、100～104、および 154 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域；
(5) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 2 2、9 0、1 0 6～1 1 5、および 1 5 5～1 5 7 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域；
(6) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 2 3、9 1～9 9、および 1 1 8～1 3 2 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域。

[0053] さらに実施形態において、本開示の抗 hGDF15 抗体は、下記 (1)～(3) から選択されるいずれかの重鎖可変領域、および下記 (4)～(6) から選択されるいずれかの軽鎖可変領域を含む：

(1) 配列番号 1 8、3 8～4 2、および 1 4 9～1 5 0 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域；
(2) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 1 9、4 6～4 8、5 2～6 6、および 1 5 1～1 5 2 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域；
(3) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 20、71、73、77、および 79 から選択されるいずれかの
アミノ酸配列を含む CDR3

を含む重鎖可変領域；

(4) 配列番号 21、81～83、85～89、100～104、および 154
から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域；

(5) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 22、90、106、108～111、113～115、および

155～157 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域；

(6) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 23、93、95～99、121、122、124、125、1

31、および 132 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域。

[0054] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、下記 (1)～(3)
から選択されるいずれかの重鎖可変領域、および下記 (4)～(6) から選択
されるいずれかの軽鎖可変領域を含む：

(1) 配列番号 18、38、および 39 から選択されるいずれかのアミノ酸配
列を含む CDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む重鎖可変領域；

(2) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 19、52、および 66 から選択されるいずれかのアミノ酸配列

を含むCDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域；

(3) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 20 および 77 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR

3

を含む重鎖可変領域；

(4) 配列番号 21 および 85 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む
CDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域；

(5) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 22、155、および 157 から選択されるいずれかのアミノ酸
配列を含むCDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域；

(6) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 23 および 95 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR

3

を含む軽鎖可変領域。

[0055] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、

(i) 配列番号 18、38～44、および 149～150 から選択されるい
ずれかのアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3

- を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；
- (ii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19、45～48、52～66、および 151～153 から選択
されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；
- (iii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20、49、50 および 67～80 から選択されるいずれかのア
ミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；
- (iv) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21、81～89、100～104、および 154 から選択され

るいずれかのアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域を含む；

(v) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 21 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 22、90、106～115、および155～157から選択さ

れるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域を含む；または

(vi) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 21 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 23、91～99、および118～132から選択されるいずれ

かのアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域を含む。

[0056] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、

(i) 配列番号 18、38～42、および149～150から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(ii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19、45～48、52～66、および 151～152 から選択
されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(iii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20、71、73、77、および 79 から選択されるいずれかの
アミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(iv) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21、81～83、85～89、100～104、および 154
から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域を含む；

(v) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 21 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 22、90、106、108～111、113～115、および

155～157 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域を含む；または

(vi) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 21 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 23、93、95～99、121、122、124、125、1

31、および132 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域を含む。

[0057] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、

配列番号 137 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1～3 個
のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 138 アミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1～3 個の
アミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 139 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1～3 個
のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 4 0 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 4 1 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 4 2 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む。

[0058] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、

配列番号 1 4 3 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 4 4 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 4 5 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 4 6 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 4 7 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 4 8 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む。

[0059] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、

配列番号 8 のアミノ酸配列と 8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号 8 のアミノ酸配列も

しくは配列番号8のアミノ酸配列において1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、または1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号9のアミノ酸配列と80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号9のアミノ酸配列もしくは配列番号9のアミノ酸配列において1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、または1～3個のアミノ酸残基改変されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む。

[0060] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、

配列番号8のアミノ酸配列、または配列番号8のアミノ酸配列においてH48R、H49R、H49D、H50R、H50S、H50F、H52R、H52Q、H72R、H73D、H73R、H73Y、H119R、H119F、H48S、H71Y、H72A、H72L、H72N、H72T、H72W、H75H、H75L、H75N、H75Q、H79H、H79K、H79Q、H79R、H83R、H117Q、H119E、H119H、H119K、H119N、H119Q、H119S、H119T、H120A、H120D、H120F、H120N、H120Q、H122F、H54T、H54N、H71R、H71H、およびH77Iから選択されるいずれかのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号9のアミノ酸配列、または配列番号9のアミノ酸配列においてL47R、L48E、L48R、L48S、L48K、L50D、L50R、L50F、L50Y、L73R、L111F、L111Y、L112E、L112R、L112D、L112F、L113D、L113R、L113F、L48H、L48Y、L50Q、L50W、L51Q、L69Y、L70F、L70H、L72D、L72E、L72R、L72Y、L73K、L73N、L73Y、L75Q、L87K、L87N、L111A、L111N、L111S、L112H、L112Q、L112T、L112Y、L113S、L114F、L114H、L114I、L114N、L114Y、L116H、L116Y、L51Y、L72F、L73Q、およびL74Hから選択されるいずれかのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む。

[0061] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、

配列番号8のアミノ酸配列、または配列番号8のアミノ酸配列においてH49

R、H49D、H50R、H50S、H50F、H73D、H73R、H73Y、H48S、H71Y、H72A、H72L、H72N、H72T、H72W、H75H、H75L、H75N、H75Q、H79H、H79K、H79Q、H79R、H83R、H119N、H119S、H120F、H120Q、H54T、H54N、H71R、およびH71Hから選択されるいずれかのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号9のアミノ酸配列、または配列番号9のアミノ酸配列においてL47R、L48E、L48R、L48K、L50D、L50R、L50F、L50Y、L73R、L112E、L112D、L112F、L113D、L113R、L113F、L48H、L48Y、L50Q、L50W、L51Q、L70F、L72D、L72E、L72R、L72Y、L73N、L73Y、L75Q、L112H、L112Q、L112Y、L113S、L116H、L116Y、L51Y、L72F、L73Q、およびL74Hから選択されるいずれかのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む。

[0062] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、

配列番号8のアミノ酸配列、または配列番号8のアミノ酸配列においてH49R、H49D、H48S、H71Y、H83R、およびH120Fから選択されるいずれかのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号9のアミノ酸配列、または配列番号9のアミノ酸配列においてL48K、L112D、L72F、およびL74Hから選択されるいずれかのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む。

[0063] これらの実施形態において、アミノ酸置換は、置換前のアミノ酸残基を示す略号、その位置を表す数字、および置換後のアミノ酸残基を示す略号で表される。例えば、「H48R」は、48番目のヒスチジン残基のアルギニン残基への置換を意味する。

[0064] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

[0065] さらに実施形態において、本開示の抗hGDF15抗体は、

配列番号4のアミノ酸配列と80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号4のアミノ酸配列もしくは配列番号4のアミノ酸配列において1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、または1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号5のアミノ酸配列と80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号5のアミノ酸配列もしくは配列番号5のアミノ酸配列において1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、または1～3個のアミノ酸残基改変されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；

配列番号6のアミノ酸配列と80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号6のアミノ酸配列もしくは配列番号6のアミノ酸配列において1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、または1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号7のアミノ酸配列と80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号7のアミノ酸配列もしくは配列番号7のアミノ酸配列において1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、または1～3個のアミノ酸残基改変されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；

配列番号133のアミノ酸配列と80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号133のアミノ酸配列もしくは配列番号133のアミノ酸配列において1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、または1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号134のアミノ酸配列と80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号134のアミノ酸配列もしくは配列番号134のアミノ酸配列において1～20個、1～1

5 個、1～10 個、1～5 個、または1～3 個のアミノ酸残基改変されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；または

配列番号135のアミノ酸配列と80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号135のアミノ酸配列もしくは配列番号135のアミノ酸配列において1～20 個、1～15 個、1～10 個、1～5 個、または1～3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号136のアミノ酸配列と80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号136のアミノ酸配列もしくは配列番号136のアミノ酸配列において1～20 個、1～15 個、1～10 個、1～5 個、または1～3 個のアミノ酸残基改変されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む。

[0066] 本明細書において、アミノ酸の改変には、アミノ酸の欠失、置換、挿入、および付加が含まれる。改変は、欠失、置換、挿入、および付加のいずれかであっても、これらの2以上の組み合わせであってもよい。改変の数は、限定はされないが、例えば、1～20 個、1～15 個、1～10 個、1～5 個、または1～3 個である。ある実施形態において、アミノ酸の改変は、アミノ酸の置換である。さらなる実施形態において、アミノ酸の改変は、1～3 個のアミノ酸の改変である。さらなる実施形態において、アミノ酸の改変は、1 個のアミノ酸の置換である。

[0067] 本明細書において、所定のアミノ酸配列を「含む」アミノ酸配列には、その所定のアミノ酸配列に1 以上のアミノ酸残基が付加されたアミノ酸配列と、その所定のアミノ酸配列からなる配列とが包含される。

[0068] 本明細書において、所定の重鎖可変領域または軽鎖可変領域のアミノ酸配列と80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域または軽鎖可変領域、および、所定の重鎖可変領域または軽鎖可変領域のアミノ酸配列において1～20 個、1～15 個、

1～10個、1～5個、または1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域または軽鎖可変領域には、その所定の重鎖可変領域または軽鎖可変領域のアミノ酸配列におけるCDRに改変が生じていない重鎖可変領域または軽鎖可変領域が含まれる。

[0069] 本明細書における、アミノ酸配列に関する「配列同一性」とは、比較対象の配列の全領域にわたって最適な状態に（一致が最大となる状態に）アラインメントされた2つの配列間で一致するアミノ酸残基の割合を意味する。ここで、比較対象の配列は、2つの配列の最適なアラインメントにおいて、付加または欠失（例えばギャップ等）を有していてもよい。配列同一性は、公共のデータベース（例えば、DDBJ（<http://www.ddbj.nig.ac.jp>））で提供されるFASTA、BLAST、CLUSTAL W等のプログラムを用いて算出することができる。あるいは、市販の配列解析ソフトウェア（例えば、Vector NTI（登録商標）ソフトウェア、GENETYX（登録商標） ver. 12）を用いて求めることもできる。

[0070] アミノ酸配列を改変し所望の特性を有する抗体を得る方法として、様々な方法が知られている。例えば、結合親和性を改善した変異体は、ファージディスプレイに基づく方法により得ることができる。この方法では、例えば、アラニンスキャニング変異導入法により抗体と抗原の相互作用に影響するアミノ酸残基を同定するか、あるいは、抗原抗体複合体の結晶構造を解析して抗体と抗原の間の接触点を同定するなどして、変異導入部位を決定する。この部位のアミノ酸を改変した変異体をエラープロードPCRや部位特異的変異導入などにより作製し、得られた変異体のライブラリーをスクリーニングすることにより、所望の特性を有する変異体を得ることができる。

[0071] 本開示の抗体は、血中GDF15濃度の低下作用を有する。かかる作用を有するか否かは、実施例に記載のように、GDF15発現がん細胞を移植した動物において対照抗体と比較して血中GDF15濃度を有意に減少させるか否かを評価することにより、確認することができる。いかなる理論にも拘束されるものではないが、本開示の抗体は、プロGDF15の切断を抑制することにより、血中GDF15

濃度を低下すると考えられる。本開示の抗体はまた、成熟GDF15に結合し、GDF15からのシグナル伝達を阻害する作用を有しうる。

[0072] 本開示の抗体は、血中GDF15濃度の低下（場合により、さらにGDF15のシグナル伝達阻害）により、体重減少、食欲不振、概日リズム障害などの症状を改善する作用を発揮しうる。

[0073] 抗体は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性や補体依存性細胞傷害（CDC）活性または体内動態の調節のため、イムノグロブリンのサブクラスが選択されていてもよく、Fc領域のアミノ酸配列または糖鎖が改変されていてもよい。例えば、補体活性化能の低減を目的として、IgG4が選択されうる。また、Fc受容体またはC1qへの結合性を低減または増強する改変、血中半減期の延長のためFcRnへの結合親和性を上昇させる改変などが行われうる。

[0074] 抗体は、また、例えば抗体の血中半減期の延長、または安定性の改善等のため、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレンまたはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとのコポリマーなどのポリマーと結合していてもよい。

[0075] 抗体は、また、化学療法薬、毒性ペプチド、放射性同位元素などと結合していてもよい。化学療法薬としては、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル、およびイホスファミドなどのアルキル化薬；アザチオプリンおよびメルカプトプリンなどの代謝拮抗薬；ビンカルカロイド（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、およびビンデシン）、タキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル）、エトポシドおよびテニポシドなどのアルカロイド；カンプトテシン（例えばイリノテカンおよびトポテカン）などのトポイソメラーゼ阻害薬；アクチノマイシン、アントラサイクリン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、バルルビシン、イダルビシン、エピルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシンおよびマイトマイシンなどの細胞傷害性抗生物質などが挙げられる。

[0076] 本開示の抗体は、医薬組成物の有効成分として使用することができる。本

開示の抗体は、血中GDF15濃度の低下作用（場合により、さらにGDF15のシグナル伝達阻害作用）を有し、GDF15に関連する疾患または症状の処置に有用である。GDF15に関連する疾患または症状としては、体重減少、食欲不振、筋量低下、活動性低下、概日リズム障害、脳下垂体ホルモン分泌異常、体温調節不全、悪液質、がん、糖尿病、腎不全、心不全、AIDS、COPD、多発性硬化症、関節リウマチ、敗血症、結核、サルコペニア、がんの骨転移、抗がん剤誘発性悪心嘔吐、妊娠悪阻、慢性骨髄増殖性疾患（例えば、骨髄線維症、真性多血症、本態性血小板血症）、神経性やせ症、双極性障害、ミトコンドリア病、ICU関連筋力低下などが挙げられる。

[0077] ある実施形態において、悪液質は、がん、糖尿病、腎不全、心不全、AIDS、COPD、多発性硬化症、関節リウマチ、敗血症、または結核に伴う悪液質である。さらなる実施形態において、悪液質は、がん悪液質である。悪液質の処置には、体重減少、食欲不振、筋量低下、活動性低下、概日リズム障害、脳下垂体ホルモン分泌異常、および体温調節不全から選択される1以上の症状の改善が含まれる。

[0078] がんとしては、限定はされないが、胃がん、食道がん、大腸がん、肺がん、膵臓がん、腎臓がん、前立腺がん、卵巣がん、乳がん、子宮頸がん、子宮体がん、精巣がん、膀胱がん、甲状腺がん、肝細胞がん、肝内胆管がん、頭頸部がん、白血病、多発性骨髄腫、リンパ腫、脳腫瘍、神経膠腫、黒色腫などが挙げられる。

[0079] 本開示の抗体は、所望の効果（例えば、GDF15に関連する疾患または症状の治療）を発揮しうる量（本明細書において、有効量という）で対象に投与される。抗体の投与量は、投与方法、投与対象の年齢、体重、健康状態等によって適宜選択される。例えば、成人1日あたり、10 $\mu\text{g/kg}$ ~100 mg/kg 、100 $\mu\text{g/kg}$ ~10 mg/kg 、または1 mg/kg ~10 mg/kg を、連日、または数日、1週間、数週間、1か月もしくは数ヵ月に1回、投与することができるが、これに限定されない。抗体の投与方法も、投与対象の年齢、体重、健康状態等によって適宜選択される。投与方法は、経口投与であっても非経口投与であっ

てもよいが、非経口投与が好ましい。非経口投与としては、皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられるが、静脈内投与によることが好ましい。

[0080] 本明細書において、「対象」は哺乳動物である。哺乳動物としては、これらに限定されるものではないが、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシ、サル、およびヒトが挙げられる。ある実施形態では、対象はヒトである。

[0081] 医薬組成物は、常法により製剤化することができる。医薬組成物は、抗体に加えて、滅菌水、生理食塩水、安定剤、賦形剤、酸化防止剤、緩衝剤、防腐剤、界面活性剤、キレート剤、結合剤などの、医薬上許容される担体または添加剤を含むことができる。

[0082] 本開示の抗体は、他の治療薬と併用してもよい。本明細書において、2種以上の有効成分を併用する場合、その全てまたは一部の有効成分が同一の組成物に含まれていてもよく、全ての薬剤が別の組成物に含まれていてもよい。また、2種以上の有効成分の投与スケジュールは同じであっても異なってもよい。

[0083] ある実施形態において、本開示の抗体は、がん治療薬と併用される。がん治療薬としては、限定はされないが、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル、およびイホスファミドなどのアルキル化薬；アザチオプリンおよびメルカプトプリンなどの代謝拮抗薬；ビンカアルカロイド（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、およびビンデシン）、タキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル）、エトポシドおよびテニポシドなどのアルカロイド；カンプトテシン（例えばイリノテカンおよびトポテカン）などのトポイソメラーゼ阻害薬；アクチノマイシン、アントラサイクリン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、バルルビシン、イダルビシン、エピルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシンおよびマイトマイシンなどの細胞傷害性抗生物質；EGFR阻害薬、HER2阻害薬、ALK阻害薬、VEGFR阻害薬などの分子標的

薬；抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体などの免疫チェックポイント阻害薬が挙げられる。

[0084] 本開示の例示的实施形態を以下に記載する。

[0085] [1]

DHCPLGPGRCCRLH（配列番号 3）のアミノ酸配列を含むhGDF15のエピトープに結合する、抗hGDF15抗体。

[2]

配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、前記 1 に記載の抗体。

[3]

配列番号 18 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む CDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 21 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、前記 1 または 2 に記載の抗体。

[4]

配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれる CDR1、または前記 CDR1 のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなる CDR1、

配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれる CDR2、または前記 CDR2 のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなる CDR2、および

配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれる CDR3、または前記 CDR3 のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなる CDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれる CDR1、または前

記CDR1のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、抗hGDF15抗体。

[5]

配列番号18のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号19のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号20のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号21のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号22のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号23のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、抗hGDF15抗体。

[6]

前記1～3個のアミノ酸残基の改変が、1個のアミノ酸残基の改変である

、前記 2 ～ 5 のいずれかに記載の抗体。

[7]

前記アミノ酸残基の改変が、アミノ酸残基の置換である、前記 2 ～ 6 のいずれかに記載の抗体。

[8]

前記 1 ～ 3 個のアミノ酸残基の改変が、1 個のアミノ酸残基の置換である、前記 2 ～ 7 のいずれかに記載の抗体。

[9]

配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む CDR3 を含む重鎖可変領域を含む、前記 1 ～ 8 のいずれかに記載の抗体。

[1 0]

配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む、前記 1 ～ 9 のいずれかに記載の抗体。

[1 1]

配列番号 1 8、3 8 ～ 4 4、および 1 4 9 ～ 1 5 0 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 1 9、4 5 ～ 4 8、5 2 ～ 6 6、および 1 5 1 ～ 1 5 3 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 2 0、4 9、5 0 および 6 7 ～ 8 0 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 2 1、8 1 ～ 8 9、1 0 0 ～ 1 0 4、および 1 5 4 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 2 2、9 0、1 0 6 ～ 1 1 5、および 1 5 5 ～ 1 5 7 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 2 3、9 1 ～ 9 9、および 1 1 8 ～ 1 3 2 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、前記 1 ～ 10 のいずれかに記載の抗体。

[1 2]

配列番号 18、38～42、および 149～150 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 19、46～48、52～66、および 151～152 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 20、71、73、77、および 79 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 21、81～83、85～89、100～104、および 154 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 22、90、106、108～111、113～115、および 155～157 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 23、93、95～99、121、122、124、125、131、および 132 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、前記 1 ～ 11 のいずれかに記載の抗体。

[1 3]

配列番号 18 および 38～44 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 19、45～48、および 52～66 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 20、49、50 および 67～80 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 21、81～89、および 100～104 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 22、90、および 106～115 から選択されるいずれかのア

ミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号23、91～99、および118～132から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、前記1～12のいずれかに記載の抗体。

[14]

配列番号18および38～42から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号19、46～48、および52～66から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号20、71、73、77、および79から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号21、81～83、85～89、および100～104から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号22、90、106、108～111、および113～115から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号23、93、95～99、121、122、124、125、131、および132から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、前記1～13のいずれかに記載の抗体。

[15]

下記(1)～(3)から選択されるいずれかの重鎖可変領域、および下記(4)～(6)から選択されるいずれかの軽鎖可変領域を含む、前記1～14のいずれかに記載の抗体：

(1) 配列番号18、38～44、および149～150から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号19のアミノ酸配列を含むCDR2、および

- 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域；
- (2) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19、45～48、52～66、および 151～153 から選択
されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域；
- (3) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20、49、50 および 67～80 から選択されるいずれかのア
ミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域；
- (4) 配列番号 21、81～89、100～104、および 154 から選択さ
れるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域；
- (5) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22、90、106～115、および 155～157 から選択さ
れるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域；
- (6) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23、91～99、および 118～132 から選択されるいずれ
かのアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域。

下記 (1) ～ (3) から選択されるのいずれかの重鎖可変領域、および下記 (4) ～ (6) から選択されるいずれかの軽鎖可変領域を含む、前記 1 ～ 15 のいずれかに記載の抗体：

(1) 配列番号 18、38～42、および 149～150 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域；

(2) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 19、46～48、52～66、および 151～152 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域；

(3) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 20、71、73、77、および 79 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域；

(4) 配列番号 21、81～83、85～89、100～104、および 154 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域；

(5) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 22、90、106、108～111、113～115、および 155～157 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域；

(6) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23、93、95～99、121、122、124、125、1
31、および 132 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域。

[17]

下記 (1) ～ (3) から選択されるいずれかの重鎖可変領域、および下記 (4)
～ (6) から選択されるいずれかの軽鎖可変領域を含む、前記 1 ～ 16 のい
ずれかに記載の抗体：

(1) 配列番号 18、38、および 39 から選択されるいずれかのアミノ酸配
列を含む CDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む重鎖可変領域；

(2) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 19、52、および 66 から選択されるいずれかのアミノ酸配列
を含む CDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む重鎖可変領域；

(3) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 20 および 77 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR
3

を含む重鎖可変領域；

(4) 配列番号 21 および 85 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む
CDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域；

(5) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 22、155、および 157 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域；

(6) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 23 および 95 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR

3

を含む軽鎖可変領域。

[18]

(i) 配列番号 18、38～44、および 149～150 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域を含む；

(ii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 19、45～48、52～66、および 151～153 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(iii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20、49、50 および 67～80 から選択されるいずれかのア
ミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(iv) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21、81～89、100～104、および 154 から選択され
るいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(v) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22、90、106～115、および 155～157 から選択さ
れるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域を含む；または

(vi) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含むCDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含むCDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含むCDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含むCDR2、および
配列番号 23、91～99、および118～132から選択されるいずれ
かのアミノ酸配列を含むCDR3
を含む軽鎖可変領域を含む、
前記 1～17 のいずれかに記載の抗体。

[19]

(i) 配列番号 18、38～42、および149～150から選択されるい
れかのアミノ酸配列を含むCDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含むCDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含むCDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含むCDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含むCDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(ii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含むCDR1、
配列番号 19、45～48、52～66、および151～152から選択
されるいずれかのアミノ酸配列を含むCDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含むCDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(iii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20、71、73、77、および 79 から選択されるいずれかの
アミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(iv) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21、81～83、85～89、100～104、および 154
から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(v) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22、90、106、108～111、113～115、および
155～157 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域を含む；または

(vi) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23、93、95～99、121、122、124、125、1
31、および 132 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む、
前記 1～18 のいずれかに記載の抗体。

[20]

(i) 配列番号 18 および 38～44 から選択されるいずれかのアミノ酸配列
を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(ii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19、45～48、および 52～66 から選択されるいずれかの
アミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(iii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20、49、50 および 67～80 から選択されるいずれかのア
ミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(iv) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21、81～89、および 100～104 から選択されるいずれ
かのアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(v) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22、90、および 106～115 から選択されるいずれかのア
ミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域を含む；または

(vi) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含むCDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含むCDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含むCDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含むCDR2、および
配列番号 23、91～99、および118～132から選択されるいずれ
かのアミノ酸配列を含むCDR3
を含む軽鎖可変領域を含む、
前記 1～19 のいずれかに記載の抗体。

[2 1]

(i) 配列番号 18 および 38～42 から選択されるいずれかのアミノ酸配列
を含むCDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含むCDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含むCDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含むCDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含むCDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(ii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含むCDR1、
配列番号 19、46～48、および52～66から選択されるいずれかの
アミノ酸配列を含むCDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含むCDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含むCDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(iii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20、71、73、77、および 79 から選択されるいずれかの
アミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(iv) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21、81～83、85～89、および 100～104 から選択
されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む；

(v) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22、90、106、108～111、および 113～115 か
ら選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3

を含む軽鎖可変領域を含む；または

(vi) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23、93、95～99、121、122、124、125、1
31、および 132 から選択されるいずれかのアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域を含む、
前記 1～20 のいずれかに記載の抗体。

[22]

配列番号 18 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 19 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 20 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 21 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 22 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域
を含む、前記 1～21 のいずれかに記載の抗体。

[23]

配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれる CDR1、CDR2、お
よび CDR3、および配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれる C
DR1、CDR2、および CDR3 を含む、前記 1～22 のいずれかに記載の抗体。

[24]

配列番号 133 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれる CDR1、また
は前記 CDR1 のアミノ酸配列において 1～3 個のアミノ酸残基が改変されたア

ミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、前記 1 に記載の抗体。

[2 5]

配列番号 1 3 7 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 3 8 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 3 9 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 4 0 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個

のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 4 1 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 4 2 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、前記 1 または 2 4 に記載の抗体。

[2 6]

配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、抗hGDF15抗体。

[2 7]

配列番号 1 3 7 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 3 8 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 3 9 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 4 0 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 4 1 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 4 2 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、抗hGDF15抗体。

[2 8]

前記 1 ～ 3 個のアミノ酸残基の改変が、1 個のアミノ酸残基の改変である、前記 2 4 ～ 2 7 のいずれかに記載の抗体。

[2 9]

前記アミノ酸残基の改変が、アミノ酸残基の置換である、前記 2 8 に記載の抗体。

[3 0]

前記 1 ～ 3 個のアミノ酸残基の改変が、1 個のアミノ酸残基の置換である、前記 2 8 または 2 9 に記載の抗体。

[3 1]

配列番号 1 3 9 のアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域を含む、前

記 1 および 2 4 ～ 3 0 のいずれかに記載の抗体。

[3 2]

配列番号 1 4 2 のアミノ酸配列を含む CDR3 を含む軽鎖可変領域を含む、前記 1 および 2 4 ～ 3 1 のいずれかに記載の抗体。

[3 3]

配列番号 1 3 7 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 1 3 8 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 1 3 9 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 1 4 0 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 1 4 1 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 1 4 2 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域
を含む、前記 1 および 2 4 ～ 3 2 のいずれかに記載の抗体。

[3 4]

配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれる CDR1、CDR2
、および CDR3、および配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に
含まれる CDR1、CDR2、および CDR3 を含む、前記 1 および 2 4 ～ 3 3 のいずれ
かに記載の抗体。

[3 5]

配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれる CDR1、または
前記 CDR1 のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたア
ミノ酸配列からなる CDR1、

配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれる CDR2、または
前記 CDR2 のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたア
ミノ酸配列からなる CDR2、および

配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれる CDR3、または
前記 CDR3 のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたア

ミノ酸配列からなるCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR1、または前記CDR1のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR1、

配列番号 1 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR2、または前記CDR2のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR2、および

配列番号 1 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれるCDR3、または前記CDR3のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなるCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、前記 1 に記載の抗体。

[3 6]

配列番号 1 4 3 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 4 4 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 4 5 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 4 6 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 4 7 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 4 8 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、前記 1 または 3 5 に記載の抗体。

[3 7]

配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれる CDR1、または前記 CDR1 のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなる CDR1、

配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれる CDR2、または前記 CDR2 のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなる CDR2、および

配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれる CDR3、または前記 CDR3 のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなる CDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれる CDR1、または前記 CDR1 のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなる CDR1、

配列番号 1 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれる CDR2、または前記 CDR2 のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなる CDR2、および

配列番号 1 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に含まれる CDR3、または前記 CDR3 のアミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列からなる CDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、抗 hGDF15 抗体。

[3 8]

配列番号 1 4 3 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む CDR1、

配列番号 1 4 4 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む CDR2、および

配列番号 1 4 5 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変領域、および、

配列番号 1 4 6 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 4 7 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR2、および

配列番号 1 4 8 のアミノ酸配列または前記アミノ酸配列において 1 ～ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、抗hGDF15抗体。

[3 9]

前記 1 ～ 3 個のアミノ酸残基の改変が、1 個のアミノ酸残基の改変である、前記 3 5 ～ 3 8 のいずれかに記載の抗体。

[4 0]

前記アミノ酸残基の改変が、アミノ酸残基の置換である、前記 3 9 に記載の抗体。

[4 1]

前記 1 ～ 3 個のアミノ酸残基の改変が、1 個のアミノ酸残基の置換である、前記 3 9 または 4 0 に記載の抗体。

[4 2]

配列番号 1 4 5 のアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域を含む、前記 1 および 3 5 ～ 4 1 のいずれかに記載の抗体。

[4 3]

配列番号 1 4 8 のアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、前記 1 および 3 5 ～ 4 2 のいずれかに記載の抗体。

[4 4]

配列番号 1 4 3 のアミノ酸配列を含むCDR1、

配列番号 1 4 4 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 1 4 5 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む重鎖可変領域、および、
配列番号 1 4 6 のアミノ酸配列を含む CDR1、
配列番号 1 4 7 のアミノ酸配列を含む CDR2、および
配列番号 1 4 8 のアミノ酸配列を含む CDR3
を含む軽鎖可変領域
を含む、前記 1 および 3 5 ~ 4 3 のいずれかに記載の抗体。

[4 5]

配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域に含まれる CDR1、CDR2
、および CDR3、および配列番号 1 3 6 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域に
含まれる CDR1、CDR2、および CDR3 を含む、前記 1 および 3 5 ~ 4 4 のいずれ
かに記載の抗体。

[4 6]

配列番号 8 のアミノ酸配列と 8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 以上
の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号 8 のアミノ酸配列も
しくは配列番号 8 のアミノ酸配列において 1 ~ 2 0 個、1 ~ 1 5 個、1 ~ 1
0 個、1 ~ 5 個、または 1 ~ 3 個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列
を含む重鎖可変領域、および

配列番号 9 のアミノ酸配列と 8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 以上
の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号 9 のアミノ酸配列も
しくは配列番号 9 のアミノ酸配列において 1 ~ 2 0 個、1 ~ 1 5 個、1 ~ 1
0 個、1 ~ 5 個、または 1 ~ 3 個のアミノ酸残基改変されたアミノ酸配列を
含む軽鎖可変領域

を含む、前記 1 ~ 4 5 のいずれかに記載の抗体。

[4 7]

配列番号 8 のアミノ酸配列と 8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % 以上
の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号 8 のアミノ酸配列も

しくは配列番号8のアミノ酸配列において1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、または1～3個のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号9のアミノ酸配列と80%、85%、90%、または95%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列、または、配列番号9のアミノ酸配列もしくは配列番号9のアミノ酸配列において1～20個、1～15個、1～10個、1～5個、または1～3個のアミノ酸残基改変されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、抗hGDF15抗体。

[48]

配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、前記1～47のいずれかに記載の抗体。

[49]

配列番号8のアミノ酸配列、または配列番号8のアミノ酸配列においてH48R、H49R、H49D、H50R、H50S、H50F、H52R、H52Q、H72R、H73D、H73R、H73Y、H119R、H119F、H48S、H71Y、H72A、H72L、H72N、H72T、H72W、H75H、H75L、H75N、H75Q、H79H、H79K、H79Q、H79R、H83R、H117Q、H119E、H119H、H119K、H119N、H119Q、H119S、H119T、H120A、H120D、H120F、H120N、H120Q、H122F、H54T、H54N、H71R、H71H、およびH77Iから選択されるいずれかのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号9のアミノ酸配列、または配列番号9のアミノ酸配列においてL47R、L48E、L48R、L48S、L48K、L50D、L50R、L50F、L50Y、L73R、L111F、L111Y、L112E、L112R、L112D、L112F、L113D、L113R、L113F、L48H、L48Y、L50Q、L50W、L51Q、L69Y、L70F、L70H、L72D、L72E、L72R、L72Y、L73K、L73N、L73Y、L75Q、L87K、L87N、L111A、L111N、L111S、L112H、L112Q、L112T、L112Y、L113S、L114F、L114H、L114I、L114N、L114Y、L116H、L116Y、L51Y、L72F、L73Q、およびL74Hから選択されるいずれかのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、前記 1 ～ 4 8 のいずれかに記載の抗体。

[5 0]

配列番号 8 のアミノ酸配列、または配列番号 8 のアミノ酸配列において H49 R、H49D、H50R、H50S、H50F、H73D、H73R、H73Y、H48S、H71Y、H72A、H72L、H72N、H72T、H72W、H75H、H75L、H75N、H75Q、H79H、H79K、H79Q、H79R、H83 R、H119N、H119S、H120F、H120Q、H54T、H54N、H71R、および H71H から選択されるいずれかのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号 9 のアミノ酸配列、または配列番号 9 のアミノ酸配列において L47 R、L48E、L48R、L48K、L50D、L50R、L50F、L50Y、L73R、L112E、L112D、L112 F、L113D、L113R、L113F、L48H、L48Y、L50Q、L50W、L51Q、L70F、L72D、L72 E、L72R、L72Y、L73N、L73Y、L75Q、L112H、L112Q、L112Y、L113S、L116H、L 116Y、L51Y、L72F、L73Q、および L74H から選択されるいずれかのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、前記 1 ～ 4 9 のいずれかに記載の抗体。

[5 1]

配列番号 8 のアミノ酸配列、または配列番号 8 のアミノ酸配列において H49 R、H49D、H48S、H71Y、H83R、および H120F から選択されるいずれかのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および

配列番号 9 のアミノ酸配列、または配列番号 9 のアミノ酸配列において L48 K、L112D、L72F、および L74H から選択されるいずれかのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、前記 1 ～ 5 0 のいずれかに記載の抗体。

[5 2]

hGDF15 との結合について、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗 hGDF15 抗体と競合する、前記 1 ～ 5 1 のいずれかに記載の抗体。

[5 3]

モノクローナル抗体である、前記 1 ～ 5 2 のいずれかに記載の抗体。

[0086] [5 4]

hGDF15との結合について、前記 1 ～ 5 3 のいずれかに記載の抗体と競合する、抗hGDF15抗体。

[5 5]

配列番号 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗hGDF15抗体と競合する、前記 5 4 に記載の抗体。

[5 6]

血中GDF15濃度を低下させる、前記 5 4 または 5 5 に記載の抗体。

[5 7]

プロGDF15の切断を抑制する、前記 5 4 ～ 5 6 のいずれかに記載の抗体。

[5 8]

モノクローナル抗体である、前記 5 4 ～ 5 6 のいずれかに記載の抗体。

[0087] [5 9]

前記 1 ～ 5 8 のいずれかに記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

[6 0]

配列番号 2 4 および／または 2 5 の核酸配列を含む、前記 5 9 に記載のポリヌクレオチド。

[6 1]

前記 5 9 または 6 0 に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[6 2]

前記 5 9 または 6 0 に記載のポリヌクレオチドを含む形質転換細胞。

[0088] [6 3]

前記 1 ～ 5 8 のいずれかに記載の抗体を含む、医薬組成物。

[6 4]

GDF15に関連する疾患または症状を処置するための、前記 6 3 に記載の医薬組成物。

[6 5]

GDF15に関連する疾患または症状が、がんである、前記 6 4 に記載の医薬組成物。

[6 6]

GDF15に関連する疾患または症状が、悪液質である、前記 6 4 に記載の医薬組成物。

[6 7]

悪液質が、がん悪液質である、前記 6 6 に記載の医薬組成物。

[6 8]

血中GDF15濃度を低下させるための、前記 6 3 に記載の医薬組成物。

[0089] [6 9]

GDF15に関連する疾患または症状の処置に用いるための、前記 1 ～ 5 8 のいずれかに記載の抗体。

[7 0]

血中GDF15濃度の低下に用いるための、前記 1 ～ 5 8 のいずれかに記載の抗体。

[7 1]

GDF15に関連する疾患または症状を処置する方法であって、処置を必要とする対象に有効量の前記 1 ～ 5 8 のいずれかに記載の抗体を投与することを含む方法。

[7 2]

血中GDF15濃度を低下させるための方法であって、前記低下を必要とする対象に有効量の前記 1 ～ 5 8 のいずれかに記載の抗体を投与することを含む方法。

[7 3]

GDF15に関連する疾患または症状を処置するための医薬の製造のための、前記 1 ～ 5 8 のいずれかに記載の抗体の使用。

[7 4]

血中GDF15濃度を低下させるための医薬の製造のための、前記1～58のいずれかに記載の抗体の使用。

[0090] 本発明を以下の実施例によりさらに説明するが、いかなる意味においても本発明は本実施例に限定されるものではない。

実施例

[0091] I. 抗体作製 (1)

A. 抗hGDF15抗体の作製

1 動物への免疫

日程

Day1 ; 初回免疫 (25 μ g/shot/body、Abisco-100、ip)

Day10 ; 2回目免疫 (25 μ g/shot/body、Abisco-100、ip)

Day17 ; 3回目免疫 (25 μ g/shot/body、Abisco-100、ip)

Day21 ; Titer check

Day24 ; Final boost (25 μ g/shot/body、Abisco-100、ip)

Day27 ; 脾臓摘出、細胞融合

試薬

・ Recombinant Human GDF15 (rhGDF15)、R&D、957-GD-025/CF、25 μ g

・ Abisco-100 (ISCONOVA)

動物

・ 3H/HeJ Jms Slc-lpr/lpr (5W、日本SLC、メス)

[0092] 手順

1. 50 μ LのhGDF15 (0.5 mg/mL)、25 μ LのAbisco-100、175 μ LのPBSを混合し、マウスの腹腔内に投与した (初回免疫)。

2. 初回免疫から10および17日後も初回免疫と同様に調製したhGDF15溶液を腹腔内投与した。

3. 初回免疫から21日後に、マウスの尾部からキャピラリー採血管を用いて採血を行い、遠心分離によって血漿を得た。

4. 血漿は100倍、1000倍、および10000倍希釈して、hGDF15を固相した96ウェ

ルプレートを用いてELISAを行い、hGDF15への抗体価が上昇している事を確認した。

5. 初回免疫から24日後に、初回免疫と同様に調製したhGDF15溶液を腹腔内投与した。

6. 初回免疫から27日後に、麻酔下で脾臓を摘出し、細胞融合を行った。

[0093] 2 細胞融合およびHAT選択

細胞

- ・ Sp2/o-14Ag (以下Sp2/o細胞、ATCC # CRL-1581)
3×10⁵ cells/mLを超えないように継代

試薬

- ・ DMEM (GIBCO、10313-021)
- ・ FBS(56℃、30分間非働化处理済み)
- ・ Penicillin-Streptomycin-Glutamine (Invitrogen、10378-016)
- ・ インシュリン (フナコシ、BT-243)10 mg/mLに調製
- ・ 55mM 2-Mercaptoethanol(1000x) (Invitrogen、21985-023)
- ・ rIL-6
- ・ PBS
- ・ チュルク液
- ・ トリパンブルー
- ・ Red blood cell lysing buffer (SIGMA、R7757)
- ・ PEG1500 (ロッシュ、108014)
- ・ HAT Media Supplement (50×) Hybri-Max (SIGMA、H0262)
- ・ HT Media Supplement (50×) Hybri-Max (SIGMA、H0137)

器具

- ・ 6ウェルプレート (BD、353046)
- ・ 浮遊細胞培養用大フラスコ
- ・ 手術用ピンセット(3本)
- ・ 手術用ハサミ(3本)

- ・ 50 mLファルコンチューブ
- ・ 1 mL シリンジ
- ・ 23G 注射針
- ・ セルストレーナー 40 μ m (BD、352340)

培地組成

- ・ Sp2/o培養用培地

DMEM	500 mL
FBS	55 mL (final 10%)
Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100×)	5 mL (final 1×)
- ・ 細胞融合用培地

DMEM	
------	--
- ・ ハイブリドーマ用培地

DMEM	500 mL
FBS	55 mL (final 10%)
Penicillin-Streptomycin-Glutamine (100×)	5 mL (final 1×)
2ME	500 μ L (final 0.1%)
インシュリン(10 mg/mL)	250 μ L (final 5 μ g/mL)
rIL-6	適宜 (final 5 ng/mL)
- ・ HAT選択培地

ハイブリドーマ用培地	
50× HAT	適宜 (final 1×)

[0094] 手順

- ・ ミエローマの準備（細胞融合1週間前）
 1. 凍結保存されていたSp2/o細胞（約 1×10^6 cells/vial）を融解し、予め15 mLファルコンチューブに分注しておいたSp2/o用培地 10 mLに懸濁し、1500rpmで3分遠心分離して洗浄し、上清を除いた。
 2. ペレット（Sp2/o細胞）をSp2/o用培地4mLに懸濁した。
 3. 6ウェルプレートの各ウェルにSp2/o用培地4 mL入れておき、2. で懸濁した

Sp2/o細胞を2倍系列で希釈した。

4. 37℃、5.5% CO₂ 下、1～2日培養した。

5. 顕微鏡観察により状態の良いウェルの細胞を回収し浮遊細胞培養用大フラスコ(または中フラスコ)に拡大培養した。細胞融合2日前に継代を行った。(細胞融合当日に 5×10^5 cells/mL前後の細胞密度になるようにした。)

[0095] ・マウスからの脾臓の摘出

1. マウスに麻酔をかけ、70%エタノールを十分に吹きかけた後、安全キャビネット内において、開腹した。無菌的に脾臓を摘出するために、滅菌済みピンセット・ハサミは外皮用と腹腔内用のものを用意した。

2. 麻酔下で腹大動脈から全採血後、脾臓を摘出した。

3. 予めPBSを入れておいた50 mLファルコンチューブに脾臓を入れ、細胞融合までの間氷上に置いた。

[0096] ・細胞融合 (ハイブリドーマの作成)

DMEM(無血清)とPEGを37℃インキュベーターで予め温めておいて以下を行った。

1. Sp2/o細胞を回収し、細胞数を数えた。 1×10^6 cells/mL以下のフラスコの細胞のみを使用した。

2. 6ウェルファルコンプレートの1ウェルにPBSを10 mL程度用意し、そこに摘出した脾臓を入れ、周辺に残っている脂肪組織を除去した。

3. 残りのウェルの1つにPBS 10 mLを新たに入れ、脾臓を移した。滅菌済みのピンセットとハサミで脾臓を半分に切った。

4. 1 mLシリンジに23Gの注射針を装着し、PBSを吸い取り、半分に切った脾臓に注入し、脾細胞をPBS中に押し出した。脾臓が白くなるまで繰り返した。

5. 50 mL ファルコンチューブ上部に滅菌済みのメッシュを置き、脾細胞を含むPBSを通すことで、脾細胞以外の組織を除いた。総量が40 mLになるように細胞融合用培地を添加した。

6. 1500rpmで3分間、遠心分離し、上清を除いた。

7. 脾細胞を細胞融合用培地20 mLに懸濁し、チュルク液を用いて染色し(チ

ユルク液：懸濁液＝10：1）、白血球をカウントした。（一般的に、 1×10^8 cells、 5×10^6 cells/mL程度となる。）

8. 1500rpmで3分間、遠心分離し、上清を除いた。

9. Red blood cell lysing buffer 3 mLに懸濁し、氷上で3分静置した。

10. 細胞融合用培地17 mL添加し、1500rpmで3分間、遠心分離し、脾細胞を回収した。

11. Sp2/o細胞を含む培地を、細胞数で脾細胞：Sp2/o細胞＝5:1になるように添加し、懸濁した。

12. 1500rpmで3分間、遠心分離し、上清を除いた。

13. 沈殿した細胞をタッピングにより再懸濁した。

14. ゆっくり攪拌しながら1分間かけてPEG1500を1 mL滴加した。

15. さらに1分間攪拌を続けた。

16. 14と同様に細胞融合用培地1 mLを滴加した。

17. さらに3分間かけて細胞融合用培地3 mLを加えた。

18. さらに1分間かけて細胞融合用培地10 mLを加えた。

19. 37°Cで10分間静置した。

20. 全量40 mLになるように細胞融合用培地を添加した。

21. 1500rpmで3分間遠心分離し、上清を除いた。

22. 脾細胞数として1 mLあたり 1×10^6 cellsになるようにハイブリドーマ用培地に懸濁し、96ウェル平底プレートにウェルあたり、100 μ Lでハイブリドーマを撒いた。

23. 37°C、CO₂ 5.5%下、o/n培養した

24. 2×HAT選択培地を100 μ L/well添加し、引き続き培養した。

25. 1日おきに上清100 μ Lを除去し、1×HAT選択培地を100 μ L添加することで培地交換をおこなった。

[0097] 3 抗体のスクリーニング

抗hGDF15抗体を産生するハイブリドーマの選択は、96ウェルプレートで培養開始から5日後に、ハイブリドーマ上清を用いてELISAにより測定したhGDF1

5への結合強度を指標に、以下のように行った。

- [0098] hGDF15 (R&D Systems、957-GD-025/CF) を固相化した96ウェルプレートの各ウェルに、100 μ Lの培養上清を添加し、2時間室温にて反応させた。ウェルを洗浄後、検出用2次抗体 (HRP標識抗マウスIgG抗体 (Promega、W402B)) を加え、1時間室温にて反応させた。ウェルを洗浄後、TMB溶液 (Sigma、T2885) を用いて発色し、プレートリーダーにて吸光度450nmを測定した。
- [0099] 450nmの吸光度が1.0以上のウェルのハイブリドーマは、さらに限界希釈法によって単クローン化を行った。最終的に16クローンを得た。得られた16クローンのうち、IgMであった1クローンおよび、非特異的に複数のタンパクに結合を示した2クローンを除いた13クローンを培養した。
- [0100] 培養上清よりHiTrap rProtein A FF (GEヘルスケアライフサイエンス、17508001) を用いて抗体の精製を行った。精製抗体の濃度はNanoDrop (Thermo Scientific) を用いて吸光度280nmを用いて計測した。
- [0101] 精製した各抗体のhGDF15との結合親和性をELISAにて以下のように測定した。200 ng/mLの濃度のhGDF15を100 μ L/wellでウェルに加えた。hGDF15を固相化した96ウェルプレートの、0.39 ng/mLから25 ng/mLで段階希釈した精製抗体を100 μ L/wellで反応させたのち、hGDF15-抗hGDF15抗体複合体をHRPコンジュゲート2次抗体で検出した。発色は450nmの吸光度を測定し、4パラメータロジスティックス曲線を用いて、5 ng/mLの濃度の抗体量の値を算出した。各抗体の結合値はクローンMAB17の値を100とし、相対値を算出した。
- [0102] hGDF15と得られた抗hGDF15抗体の親和性の結果を表1に示す。MAB17よりもはるかに強い結合を示したMAB2をヒト化した。

[表1]

クローン	MAB17の値を100とした相対値
MAB3	72.3
MAB4	44.2
MAB5	36.4
MAB6	68.1
MAB1	33.6
MAB11	12.0
MAB12	36.2
MAB13	50.1
MAB7	3.1
MAB15	25.1
MAB14	26.4
MAB17	100.0
MAB2	350.9

[0103] 4 ヒト化抗体の作製

・細胞

細胞株名 : ExpiCHO

由来 : チャイニーズハムスター

細胞入手先 : Thermo Fisher Scientific (A29127)

培養液 : ExpiCHO expression medium

培養液入手先 : Thermo Fisher Scientific (A2910001)

[0104] ・発現ベクター

ベクター名 : pcDNA-3.1

cDNA由来 : 全合成

入手先 : Thermo Fisher Scientific

[0105] ・リコンビナントタンパク質

タンパク質名 : ヒトGDF15

由来 : CHO細胞

入手先 : R&D systems (957-GD-025/CF)

[0106] ・キメラ抗体の配列のデザイン

マウス由来の抗体であるMAB2のCDR配列を含む可変領域とベバシズマブ (bevacizumab) の定常領域をつなぎ合わせキメラ抗体の配列とした。

[0107] ・ ヒト化抗体の配列のデザイン

BlastサーチにてMAB2に類似性の高いヒト抗体を検索した。これらヒト抗体にCDR配列を置換し、可変領域を作製し、ベバシズマブの定常領域をつなぎ合わせ全長ヒト化抗体を作成した。また、構造予測から構造の維持に重要だと考えられたアミノ酸に関しては、マウス抗体のアミノ酸をそのまま残し、ヒト化抗体の一部とした。

[0108] ・ 抗体の作製と精製

重鎖および軽鎖遺伝子を全合成し、それぞれ発現ベクターに組み込んだ。24ウェルプレートにExpiCHO細胞を播種し、翌日、重鎖および軽鎖発現ベクターをTransIT-CHO kit (Takara、V2170) にて遺伝子導入 (co-transfection) して、重鎖および軽鎖を共発現させた。5日後、産生された抗体を含む培養上清をすべて回収し、Hitrap rProteinA FFカラム (GE healthcare、17-5080-01) を用いて抗体を精製した。

[0109] ・ 抗体濃度の測定

上清中の抗体濃度は、Human IgG EIAキット (Takara、MK136) にて、添付のプロトコールに従って測定した。精製抗体はNanoDrop (Thermo Fisher Scientific) にて吸光度は280nmを測定し、濃度を決定した。

[0110] ・ hGDF15に対する結合量の測定 (ELISA)

96ウェルプレートに100 μ LのヒトGDF15溶液 (0.4 μ g/mL) を入れ、翌朝まで静置し、ELISAプレートを作製した。プレートブロッキングは1% BSAで1時間行い、抗体を含む培養上清は公比3の希釈系列を作製して、ELISAプレートに100 μ Lずつ添加し、2時間静置した。2次抗体の反応は、20000倍希釈したHRP複合抗ヒトIgG抗体 (Gene Tex、GTX26759) を100 μ L添加し、1時間反応させた。発色反応はTMB (Sigma、T-0440) を使用し、反応停止液は2規定の硫酸を使用した。吸光度は450nmを測定した。

[0111] ・ BLITZを用いた結合親和性の測定

抗体の結合親和性は、生体分子間相互作用解析システムであるBLITZ (Pall ForteBio) を用いて測定した。センサーチップにはAnti-HIS (Pall ForteBio、18-5114) を、洗浄液にはForteBio Sample Diluent (Pall ForteBio、18-1048) をそれぞれ使用した。測定プログラムは、hGDF15のセンサーチップへの吸着に60秒、抗体の結合に120秒、解離に120秒で設定した。

[0112] B. 配列決定

1 試験方法

10cmシャーレで培養したハイブリドーマからトータルRNAを調製し、SMARTer RACE 5' /3' Kit (Takara、634858) を用いてcDNAを合成した。合成されたcDNAをpCR4Blunt-TOPO vectorに組み込み、大腸菌を用いて増幅させ、プラスミドDNAを精製した。DNAの配列決定は、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, 4337454) とM13プライマーを用いて、ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) にて行った。

[0113] 2 結果

MAB17、MAB2、およびHuMAB2のアミノ酸配列を表2に、CDR配列を表3に、HuMAB2のcDNA配列を表4に示す。CDRは、Kabatの定義により特定した。

[表2-1]

抗体名	配列名 (ペクター名)	アミノ酸配列 (下線部は CDR 配列)	配列 番号
MAB2	H 鎖可変領域	MRMLSVLYLLSALPGILSDVQLQESGPSLVRPSQTL SLTCTVTGFSIN <u>SDCYWI</u> WIRQFPGNKLEYIG <u>YTFYSGIT</u> <u>YYNPSLAS</u> RTYITRDTSKNQFSLKLSVTTEDTATYYC <u>ARDCDYAMDY</u> WGQGSTVTVS	4
	L 鎖可変領域	MGYSAQFLGLLLLCFQGTTRCDIQMTQTSSLSASLGDR VTISC <u>RASQDISNYLN</u> WYQQKPDGTVKLLIH <u>YTSTLHS</u> GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC <u>QQGNL</u> <u>PWTF</u> GGGKLEIKRADA	5
MAB17	H 鎖可変領域	MDRLTFSFLLLIIVPAYVLSQVTLKESGPGILQPSQTL SLTCSFSGFSLNTHGMGVGWIRQPSGKLEWLANIWWND DKYYNSALKSRLTLSKDTSNQVFLKISSVDTADTATY FCAQVAWDWFAYWGQGLVTIS	6
	L 鎖可変領域	MDSQVQIFSFLIISASVILSRGQIVLTQSPAIMSASLG EEITLTCSASSSVRYMHYQQKSGTSPKVLIIYSTNLA SGVPSRFSGSGSGTFYSLTISSVEAEDAADYYCHQWSS YPWTFGGGKLEIKRADA	7

[表2-2]

抗体名	配列名 (ペクター名)	アミノ酸配列 (下線部はCDR配列)	配列 番号
HuMAB2	H鎖可変領域	MKHLWFLLLLAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGFSIN <u>SDCYWI</u> WIRQPPGKLEYIG <u>YTFYSGIT</u> <u>YYNPSLAS</u> RRTTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC AR <u>DCDYAMDY</u> WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSG	8
	L鎖可変領域	MRVPAQLLGLLLLWLPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC <u>RASQDISNYLN</u> WYQQKPGKAVKLLIH <u>YTSTLHS</u> GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFC <u>QQGNL</u> <u>PWT</u> FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIAPP	9
	H鎖全長 (H3delK)	MKHLWFLLLLAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGFSIN <u>SDCYWI</u> WIRQPPGKLEYIG <u>YTFYSGIT</u> <u>YYNPSLAS</u> RRTTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYC AR <u>DCDYAMDY</u> WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKEVEPKSCDKHTCTCPPELLEGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG	10
	L鎖 (L7)	MRVPAQLLGLLLLWLPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITC <u>RASQDISNYLN</u> WYQQKPGKAVKLLIH <u>YTSTLHS</u> GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFC <u>QQGNL</u> <u>PWT</u> FGQGTKLEIKRTVAAPSVFIAPPDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC	11

[表3]

抗体名	鎖	CDR番号	配列	配列 番号
MAB17	H鎖	CDR-H1	THGMGVG	12
	H鎖	CDR-H2	NIWWNDDKYNSALKS	13
	H鎖	CDR-H3	VAWDWFAY	14
	L鎖	CDR-L1	SASSSVRYMH	15
	L鎖	CDR-L2	STSNLAS	16
	L鎖	CDR-L3	HQWSSYPWT	17
MAB2 HuMAB2	H鎖	CDR-H1	SDCYWI	18
	H鎖	CDR-H2	YTFYSGITYYNPSLAS	19
	H鎖	CDR-H3	DCDYAMDY	20
	L鎖	CDR-L1	RASQDISNYLN	21
	L鎖	CDR-L2	YTSTLHS	22
	L鎖	CDR-L3	QQGNTLPWT	23

[表4-1]

抗体名	配列名 (ベクター名)	cDNA 配列	配列 番号
HuMAB2	H 鎖可変領域	ATGAAGCACCTGTGGTTTCTGCTGCTGCTGGCCGCTCC CAGATGGGTGCTGTCTCAGGTGCAGCTGCAGGAATCTG GCCCTGGCCTCGTGAAGCCCAGCGAGACACTGAGCCTG ACCTGTACCGTGTCCGGCTTCAGCATCAACAGCGACTG CTA CTGGATCTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGCC TGGAGTACATCGGCTACACCTTCTACAGCGGCATCACC TACTACAACCCAGCCTGGCCAGCCGACCACCATCAG CAGAGACACCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTGA GCAGCGTGACAGCCGCCGATACCGCGTGTACTACTGC GCCAGAGACTGCGACTACGCCATGGACTATTGGGGCCA GGGCACCCCTCGTGACCGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGG GCCCCAGCGTGTTCCTCTGGCCCTAGCAGCAAGAGC ACATCTGGC	24
	L 鎖可変領域	ATGAGAGTGCCCTGCTCAGCTGCTGGGACTGCTGCTGCT GTGGCTGCCTGGCGCTAGATGCGACATCCAGATGACCC AGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAA CTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAGGCCG TGAAGCTGCTGATCCACTACACCAGCACCTGCACAGC GGCGTGCCAGCAGATTTCTGGCAGCGGCTCCGGCAC CGACTACACCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGG ACTTCGCTACCTACTTCTGTGTCAGCAAGGCAACACCTG CCCTGGACCTTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAAATCAA GCGGACAGTGGCCGCTCCAGCGTTCATCTTCCAC CT	25

[表4-2]

抗体名	配列名 (ベクター名)	cDNA配列	配列 番号
HuMAB2	H鎖全長 (H3de1K)	ATGAAGCACCTGTGGTTTCTGCTGCTGCTGGCCGCTCC CAGATGGGTGCTGTCTCAGGTGCAGCTGCAGGAATCTG GCCCTGGCCTCGTGAAGCCCAGCGAGACACTGAGCCTG ACCTGTACCGTGTCCGGCTTCAGCATCAACAGCGACTG CTACTGGATCTGGATCAGACAGCCCCCTGGCAAGGGCC TGGAGTACATCGGCTACACCTTCTACAGCGGCATCACC TACTACAACCCAGCCTGGCCAGCCGGACCAACATCAG CAGAGACACCAGCAAGAACAGTTTCAGCCTGAAGCTGA GCAGCGTGACAGCCGCGGATACCGCCGTGTAATACTGC GCCAGAGACTGCGACTACGCCATGGACTATTGGGGCCA GGGCACCCCTCGTGACCGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGG GCCCCAGCGTGTCCCTCTGGCCCTAGCAGCAAGAGC ACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAA AGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAACCT CTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGACACCTTTCCAGCC GTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACTCTGTGTCCAGCGT CGTGAAGTGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAACCAACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGAC CCACACCTGTCCCCCTGTCTGCCCCCGAACTGCTGG GAGGCCCTTCCGTGTCTCTGTCCCCCAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCGAAGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCTGAAGTGA AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAAC GCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCAC CTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGTGACACAGG ACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCC AACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAGGCCAAGGGACAGCCCCGAGCCCCAGGTGTACA CACTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAATCAG GTGTCCCTGACATGCCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTC CGATATTGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCG AGAACAATAACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGC GACGGCTCATCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGA CAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTGAGCTGCA GCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCTAA	26

[表4-3]

抗体名	配列名 (ベクター名)	cDNA配列	配列 番号
HuMAB2	L鎖全長 (L7)	ATGAGAGTGCCTGCTCAGCTGCTGGGACTGCTGCTGCT GTGGCTGCCTGGCGCTAGATGCGACATCCAGATGACCC AGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAA CTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAGGCCG TGAAGCTGCTGATCCACTACACCAGCACCCCTGCACAGC GGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCAC CGACTACACCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGG ACTTCGCTACCTACTTCTGTGTCAGCAAGGCAACACCCTG CCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAA GCGGACAGTGGCCGCTCCAGCGTGTTTCATCTTCCCAC CTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACC GCCTCTGTC GTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAA GGTGCAGTGGAAAGTGGACAATGCCCTGCAGTCCGGCA ACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGAC TCCACCTACAGCCTGTCCTCCACCCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAG TGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCTGTGACCAAGAGC TTCAACCGGGGCGAGTGCTGA	27

[0114] C. 既存の抗hGDF15抗体との比較

1 試験材料および方法

抗hGDF15抗体

HuMAB2との反応性比較に用いた抗体を表5に示す。

[表5]

抗体名	種類
MAB17	マウス、モノクローナル
MAB3	マウス、モノクローナル
MAB4	マウス、モノクローナル
MAB5	マウス、モノクローナル
MAB6	マウス、モノクローナル
MAB1	マウス、モノクローナル
MAB11	マウス、モノクローナル
MAB12	マウス、モノクローナル
MAB13	マウス、モノクローナル
Hu01G06-127 ¹⁾	ヒト化、モノクローナル
MAB957 ²⁾	マウス、モノクローナル
Biotinylated Goat Anti-Human GDF-15 Detection Antibody ³⁾	ヤギ、ポリクローナル

1) ヒト化抗hGDF15抗体 (WO2014/100689)

2) R&D Systems、MAB957、Lot No: UDC1014011

3) R&D Systems、DY957

[0115] 試験方法

HuMAB2および表5に示す抗GDF15モノクローナル抗体 (2 $\mu\text{g/mL}$) を100 $\mu\text{L/well}$ にて96ウェルプレートに添加して、それぞれ固相化したプレートへ、1 ng/mlの濃度から段階希釈したhGDF15 (R&D Systems、957-GD-025/CF) を100 $\mu\text{L/well}$ 反応させた。EZ-Link Micro NHS-PEG4-Biotinylation Kit (Thermo Fisher Scientific、21955) を用いてビオチン化したHuMAB2を検出抗体 (1 $\mu\text{g/mL}$ を100 $\mu\text{L/well}$) として用いた。サンドイッチELISA成立可否は、Human GDF15 ELISA Kit (R&D Systems、DY957) 添付のStreptavidin-HRP conjugateを用いて検出した。サンドイッチELISAのポジティブコントロール抗体 (PC) として、いずれのモノクローナル抗体ともサンドイッチが可能なHuman GDF15 ELISA Kit (R&D Systems、DY957) 添付の検出抗体 (表5) を用いた。

[0116] 2 結果

固相化した抗体とビオチン化した抗体が類似のエピトープを認識している

場合、競合阻害が起きるが、異なるエピトープを認識している場合は競合阻害は起きないと考えられる。図1に示すように、HuMAB2は他の抗体と同時にhGDF15を認識することができた。このことから、HuMAB2は他の抗体と異なるエピトープを認識することが示唆された。

[0117] 上記のとおり、HuMAB2は既存の抗体と競合しないことが明らかとなった。そこで、今回得られた他の抗体がHuMAB2と競合するか否かを、前記と同じ方法で試験した。結果を阻害%で算出し、表6に示した。試験した8クローンのうち、4クローン（MAB1、MAB11、MAB12およびMAB13）が、HuMAB2とhGDF15の結合を70%以上阻害することが明らかとなった。

[表6]

各hGDF15モノクローナル抗体の競合試験結果

クローン	阻害%
MAB3	11
MAB4	46
MAB5	45
MAB6	22
MAB1	82
MAB11	73
MAB12	73
MAB13	79
MAB17	0
HuMAB2	80

[0118] D. hGDF15とHuMAB2 Fabとの複合体の結晶化

1 試験材料および方法

hGDF15 (R&D Systems、9279-GD-050)に対して、HuMAB2 Fab（配列番号8のアミノ酸配列からなるポリペプチドおよび配列番号9のアミノ酸配列からなるポリペプチドを含む）（20 ml Tris-HCl、200 mM NaCl、pH7.2）をモル比1:1で濃度が5 mg/mLとなるように混合し、複合体の蛋白溶液を調製した。HuMAB2結晶化はSitting drop蒸気拡散法で行った。蛋白溶液とリザーバー溶液の混合比は1:1とした。スクリーニングキットCrystal Screen 2 (Hampton Research)

ch、HR2-112)で得られた結晶を用いて、複合体の結晶構造を分解能2.8 Åで決定した。位相決定は分子置換法で行った。

[0119] 2 結果

立体構造解析により、hGDF15はホモ2量体を形成しており、hGDF15の2量体に2分子のHuMAB2のFabが結合していることがわかった（図2A）。HuMAB2とhGDF15の結合境界面に並ぶアミノ酸をそれぞれパラトープとエピトープとして同定した（図2B）。表7に、同定されたhGDF15のエピトープおよび結合に重要なHuMAB2上のアミノ酸を下線で示す。

[表7]

		アミノ酸配列	配列番号
HuMAB2	H鎖可変領域	MKHLWFLLLLAAPRWVLSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSINSDCYWIIWIRQPPGKLEYIGYTFYSGITYYNPSLASRTTISRDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARDCDYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG	8
	L鎖可変領域	MRVPAQLLGLLLWLPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIHVTSTLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP	9
hGDF15		ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWADWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQIKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQKTDTGVSLQT YDLLAKDCH CI	2

[0120] MOE (Molecular Operating Environment) を用いて解析したhGDF15のエピトープを図3に示す。HuMAB2は、hGDF15単量体の1つ (Monomer1) 上のN端側の5番目のアスパラギン酸から18番目のヒスチジンまでの14アミノ酸、45番目のイソロイシン (45I) および46番目のグリシン (46G) に、もう1つの単量体 (Monomer2) 上の71番目のアスパラギン酸 (71D) および72番目のスレオニン (72T) に結合することが明らかとなった。

[0121] エピトープ内でHuMAB2との相互作用に特に強く関わっていると推定されるアミノ酸残基をMOEのProtein Contactsを用いて計算した (表8)。その結果

、図3に示すアミノ酸が特に強くHuMAB2と結合していることが示された。

[表8]

抗体	hGDF15	E (kcal/mol)
L Asn112	Arg13	-6.5
H Asp119	Arg16	-3.4
H Phe71	His6	-1.6
H Tyr69	His6	-1.4
L Asn51	Thr72	-1.2
L Tyr70	Thr72	-1.1
H Ile75	His6	-1.1
H Tyr120	Leu17	-0.91
L Trp116	Gly10	-0.76
H Tyr52	Cys 7	-0.72

*上位10を表示

[0122] E. hGDF15および変異hGDF15に対する抗hGDF15抗体の反応性

1 試験材料および方法

試験材料

HuMAB2抗体との反応性比較に用いた抗体を表9に示す。

[表9]

抗体名	種類
MAB17	マウス, モノクローナル
Hu01G06-127 ¹⁾	ヒト化, モノクローナル
MAB957 ²⁾	マウス, モノクローナル
Biotinylated Goat Anti-Human GDF-15 Detection Antibody ³⁾	ヤギ, ポリクローナル

1) ヒト化抗hGDF15抗体 (WO2014/100689)

2) R&D Systems、MAB957、Lot No: UDC1014011

3) R&D Systems、DY957

[0123] 試験方法

試験概要

変異hGDF15発現用コンストラクトをExpiCHO-S細胞へトランスフェクション

し、培養後、培養上清を回収した。回収した培養上清中の各変異hGDF15の発現を市販のGDF15測定用ELISAキットにて確認した後、各変異hGDF15に対するHuMAB2の反応性をELISA法で評価した。エピトープの中で特に重要なアミノ酸残基の同定には、変異導入GDF15に対するHuMAB2の反応性をELISAおよび生体分子間相互作用解析システムの2方法にて評価した。HuMAB2と他の抗hGDF15抗体とのエピトープの違いによる差別化の検証は、変異hGDF15に対する他の抗hGDF15抗体の反応性とHuMAB2の反応性をサンドイッチELISA法で比較することにより行った。

[0124] 変異hGDF15の調製

各変異hGDF15遺伝子が導入されたpcDNA-3.1ベクター (Thermo Fisher Scientific) を、ExpiCHO™ Expression System Kit (Thermo Fisher Scientific、A29133) を用いて、キットに含まれるExpiCHO-S (Thermo Fisher Scientific) 細胞へトランスフェクションした。トランスフェクション後10日目の培養上清を4℃にて8000rpmで30分間遠心分離し、培養上清を回収した。回収した培養上清は、冷凍（設定温度-20℃）保存した。

[0125] 変異hGDF15の発現確認

回収した培養上清中の変異hGDF15は、Human GDF15 ELISA Kit (R&D Systems、DY957) を用いて、キットの添付文書に従って測定を実施し、発現の確認と濃度測定を行った。

[0126] 変異hGDF15に対するGDF15抗体の反応性評価

野生型 (Wild-type: Wt) hGDF15は、Recombinant Human GDF15 (R&D Systems、957-GD-025/CF) を用いた。各hGDF15抗体を固相したプレートに段階希釈したWtおよび変異hGDF15を反応させ、結合したWtおよび変異hGDF15をHuman GDF15 ELISA Kit (R&D Systems、DY957) の検出抗体（表9）を用いて検出した。

[0127] 生体分子間相互作用解析システムによる変異導入GDF15に対するHuMAB2の反応性評価

各変異hGDF15はMAB17をセファロース (GE Healthcare、17-0906-01) に固

定したアフィニティ・カラムを用いて精製した。生体分子間相互作用解析システムでの評価はOCTET QKe (ForteBio) を用いて行った。WtのGDF15はRecombinant Human GDF15 (R&D Systems、957-GD-025/CF) を用いた。バイオセンサーNi-NTA (ForteBio、18-5101) にWtおよび変異hGDF15を結合させ、続いて段階希釈したHuMAB2を反応させて、変異hGDF15とHuMAB2間の相互作用を評価した。解析はKinetics Methodを用いて実施した。

[0128] 2 結果

野生型 (WT) hGDF15および変異hGDF15のアミノ酸配列を表10に示す。野生型hGDF15のアミノ酸をアラニンに置換した部位を下線で示している。

[表10]

	配列	配列 番号
hGDF15 (WT)	ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSQT YDDLLAKDCH CI	2
H6A	ARNGD <u>A</u> CPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSQT YDDLLAKDCH CI	28
R13A	ARNGDHCPLG PG <u>A</u> CCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSQT YDDLLAKDCH CI	29
R16A	ARNGDHCPLG PGRCC <u>A</u> LHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSQT YDDLLAKDCH CI	30
R13A、R16A	ARNGDHCPLG PG <u>A</u> CC <u>A</u> LHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSQT YDDLLAKDCH CI	31
3A	ARNGDHCPLG P <u>A</u> CC <u>A</u> LHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSQT YDDLLAKDCH CI	32
4A	ARNGDHCPLG P <u>A</u> CC <u>AA</u> HTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSQT YDDLLAKDCH CI	33
6A	ARNGDHCPL <u>A</u> <u>AA</u> CC <u>AA</u> HTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSQT YDDLLAKDCH CI	34
8A	ARNGDHC <u>AAA</u> <u>AA</u> CC <u>AA</u> HTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP DTVPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSQT YDDLLAKDCH CI	35
T72A	ARNGDHCPLG PGRCCRLHTV RASLEDLGWA DWVLSPREVQ VTMCIGACPS QFRAANMHAQ IKTSLHRLKP D <u>A</u> VPAPCCVP ASYNPMVLIQ KTDGTGVSQT YDDLLAKDCH CI	36

[0129] 表 1 1 に、4種の抗hGDF15抗体とhGDF15および変異hGDF15との結合を示す。

HuMAB2は、変異hGDF15と結合しないか、野生型hGDF15との結合よりも弱く結合したが、他の抗hGDF15抗体とhGDF15との結合は変異によって影響されなかった。このことから、HuMAB2のhGDF15のエピトープのうちN末端側の5DHCPLGPGRCCRLH18（配列番号3）が結合に重要であり、特に13Rと16RがHuMAB2の結合に重要であることがわかった。また、この結果からも、MAB17、Hu01G06-127、およびMAB957はHuMAB2とはエピトープが異なることが支持された。

[表11]

	抗GDF15抗体			
	HuMAB2	MAB17	Hu01G06-127	MAB957
hGDF15 (WT)	100	100	100	100
H6A	136.1 $\pm$ 1.4	87.7 $\pm$ 5.0	90.5 $\pm$ 2.3	88.3 $\pm$ 2.6
R13A	17.8 $\pm$ 1.4	97.2 $\pm$ 0.6	91.4 $\pm$ 3.5	89.9 $\pm$ 0.5
R16A	24.0 $\pm$ 0.9	101.2 $\pm$ 4.1	102.0 $\pm$ 4.3	93.9 $\pm$ 0.8
R13A、R16A	4.9 $\pm$ 0.9	83.0 $\pm$ 1.0	87.6 $\pm$ 3.0	80.6 $\pm$ 1.9
3A	0.4 $\pm$ 0.2	109.8 $\pm$ 1.3	96.2 $\pm$ 0.2	99.0 $\pm$ 1.6
4A	0.0 $\pm$ 0.1	95.0 $\pm$ 1.2	83.5 $\pm$ 1.3	84.1 $\pm$ 0.6
6A	0.0 $\pm$ 0.0	83.9 $\pm$ 1.9	61.6 $\pm$ 0.5	74.3 $\pm$ 4.1
8A	-0.1 $\pm$ 0.1	78.8 $\pm$ 0.2	57.1 $\pm$ 0.6	69.2 $\pm$ 1.9
T72A	100.9 $\pm$ 2.7	104.4 $\pm$ 4.4	107.7 $\pm$ 6.9	101.2 $\pm$ 3.7

抗GDF15抗体と500 pg/mLのhGDF15との結合量を100とした時の各変異hGDF15との結合を相対値で表した。N=3。値は平均値 $\pm$ SD。

[0130] F. エピトープ領域ペプチドに対するHuMAB2抗体の反応性評価

1 試験方法

hGDF15の5番目のアスパラギン残基から18番目のヒスチジン残基までの14残基（DHCPLGPGRCCRLH、配列番号3）がHuMAB2の結合に重要であることが明らかとなったことから、この配列のペプチドをGenScript社で合成した（表12）。Peptide 1は、両末端ともに未修飾とし、Peptide 2は、この領域がhGDF15内ではインターナルな領域であるため、その状態を模倣する目的でアミノ末端をアセチル化し、カルボキシル末端をアミド化して合成した。10 μ g/mLのペプチド溶液を100 μ L/wellで添加して固相した96ウェルプレートに、HuMAB2抗体（10 μ g/mL）を100 μ L/wellで添加して反応させた（3時間25℃）。結合したHuMAB2抗体を、5000倍希釈した抗ヒトIgG-HRP（Jackson ImmunoResearch

ch、109-035-008) を100 μ L/wellにて添加し、25℃で1時間反応させて、検出した。プレートのコントロールとして、hGDF15 (R&D Systems、957-GD-025/CF) を固相したプレートを用いた。ペプチドへ反応するポジティブコントロール抗体としてHuman GDF15 ELISA Kit (R&D Systems、DY957) の検出抗体 (表9) を、ネガティブコントロール抗体としてHuman IgG1 Isotype control (Abcam、ab206198)を用いた。

[表12]

合成ペプチド

ペプチド名	配列	修飾
Peptide 1	DHCPLGPGRCRLH (配列番号3)	なし
Peptide 2	DHCPLGPGRCRLH (配列番号3)	N末端アセチル化およびC末端アミド化

[0131] 2 結果

図4に示すように、ポジティブコントロール抗体である抗hGDF15ポリクローナル抗体は、2種類のペプチドおよびhGDF15のいずれにも反応した。これに対し、HuMAB2はhGDF15にのみ反応し、2種類の合成ペプチドに対してはネガティブコントロール抗体であるHuman IgG1 Isotype control (hIgG1) と同様に反応を示さなかった。この結果から、HuMAB2のhGDF15のエピトープへの結合には、周辺の配列または立体構造が重要であることが示唆された。

[0132] G. CDR中のアミノ酸置換によるHuMAB2変異体のhGDF15への結合

1 試験材料および方法

試験系

細胞

- 1) 細胞株名 : ExpiCHO
- 2) 由来 : チャイニーズハムスター
- 3) 細胞入手先 : Thermo Fisher Scientific (A29127)
- 4) 培養液 : ExpiCHO expression medium

5) 培養液入手先 : Thermo Fisher Scientific (A2910001)

抗体発現ベクター

1) ベクター名 : pcDNA-3.1

2) cDNA由来 : 全合成

3) 入手先 : Thermo Fisher Scientific

リコンビナントタンパク質

1) タンパク質名 : ヒトGDF15 (hGDF15)

2) 由来 : CHO細胞

3) 入手先 : R&D systems (957-GD-025/CF)

[0133] 試験方法

発現ベクターのデザイン

HuMAB2とhGDF15の結晶構造解析から得られた情報から、抗体と抗原の結合境界面に並ぶアミノ酸をパラトープとエプトープとし、HuMAB2の重鎖または軽鎖にアミノ酸変異を挿入した発現ベクターをデザインした。表13に変異抗体の一覧を示す(改変したアミノ酸を下線で示す)。重鎖および軽鎖とも、N末端からFR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4の順で並んでいる。

[0134] 発現ベクターの細胞導入

24ウェルプレートにCHO細胞を播種し、翌日、表13の変異抗体の発現ベクターを重鎖および軽鎖で組み合わせてTransIT-CHO kit (Takara, V2170) にて遺伝子導入した。5日後上清をすべて回収して、使用まで-20℃設定の冷凍庫で保存した。

[0135] hGDF15に対する結合量の測定

96ウェルプレートに100 μ LのhGDF15溶液 (0.4 μ g/ml) を加え、翌朝まで4℃にて静置し、ELISAプレートを作成した。1%BSAを加え、1時間ブロッキングを行い、変異抗体を含む培養上清は30倍希釈から希釈系列(希釈倍率の公比3)を作製して、ELISAプレートに100 μ Lずつ添加し、2時間静置した。2次抗体として、HRP複合抗ヒトIgG抗体 (Gene Tex, GTX26759) (20000倍希釈) を添加し、1時間静置した。発色反応はTMB (Sigma, T-0440) を使用し、反

応停止液は2規定の硫酸を使用した。吸光度は450nmを測定した。

[0136] OCTETを用いた抗体濃度の測定

培養上清中の抗体濃度は、生体分子間相互作用解析システムであるOCTET Q Ke (Pall ForteBio) にて測定した。センサーチップにはProtein L (Pall ForteBio、18-5085) を、センサーチップの再生液には10 mM Glycine (pH1.1) を、洗浄液にはForteBio Sample Diluent (Pall ForteBio、18-1048) をそれぞれ使用した。スタンダードには、IgG from human serum reagent grade (Sigma-Aldrich、I12511-10MG) を50 mg/mL、10 mg/mL、1 mg/mL、および0.1 mg/mLで使用し、測定する培養上清はSample Diluent (Pall ForteBio、18-1104) にて2倍希釈して使用した。測定プログラムは、センサーチップの再生を5秒と洗浄に5秒を3サイクル繰り返したのち、抗体濃度測定を120秒で設定した。

[0137] HuMAB2との結合量の比較

抗体5 ng/mLにおけるヒトhGDF15に対する結合量をエクセル上で計算し、HuMAB2のhGDF15への結合量を100とした際の、各変異抗体の結合量を相対値で表した。3回の独立した試験をおこない平均値±標準誤差を求めた。変異を入れた事によって抗体が発現しなくなった抗体の結合量は0とした。結果を図5 A～Dに示す。

[0138] 2 結果

相対結合量がHuMAB2の1.5倍以上を示した抗体が5種類見出せた。一方、50%以下の結合量の低下が30種類で観察された。図5 Aの「H鎖改変抗体1/2」には「H50S-L7」の結果が2つ示されているが、これらは培養およびELISAにおけるウェル間誤差の確認のために置いた同一のベクターによる結果である。2つともが同程度の値である事から安定した試験系であることが示された。

[0139] 重鎖変異抗体であるH48S-L7、H83R-L7、およびH120F-L7、軽鎖変異抗体であるH3-L48KおよびH3-L112Dでは、HuMAB2に比べ結合力が約1.5倍上昇していた。一方、HuMAB2の軽鎖の111番目のグリシン (111G) の変異体および114番目のロイシン (114L) の変異体はいずれも結合量の低下が認められたことか

ら、これらのアミノ酸がhGDF15への結合およびHuMAB2のCDR配列の構造維持に重要な部位であることが示唆された。

[0140] [表13-1]

抗体名	配列名		変異場所		配列	配列番号
	H鎖	L鎖	鎖	領域		
H48R-L7	H48R	L7	H鎖	FR1	DVQLQESGPGLVKPSSETLSLTC TVSGFSIR	37
H49R-L7	H49R	L7	H鎖	CDR-H1	RDCYWI	38
H49D-L7	H49D	L7	H鎖	CDR-H1	DDCYWI	39
H50R-L7	H50R	L7	H鎖	CDR-H1	SRCYWI	40
H50S-L7	H50S	L7	H鎖	CDR-H1	SSCYWI	41
H50F-L7	H50F	L7	H鎖	CDR-H1	SFCYWI	42
H52R-L7	H52R	L7	H鎖	CDR-H1	SDCRWI	43
H52Q-L7	H52Q	L7	H鎖	CDR-H1	SDCQWI	44
H72R-L7	H72R	L7	H鎖	CDR-H2	YTFRSGITYYNPSLAS	45
H73D-L7	H73D	L7	H鎖	CDR-H2	YTFYDGYTYYNPSLAS	46
H73R-L7	H73R	L7	H鎖	CDR-H2	YTFYRGITYYNPSLAS	47
H73Y-L7	H73Y	L7	H鎖	CDR-H2	YTFYYGYTYYNPSLAS	48
H119R-L7	H119R	L7	H鎖	CDR-H3	DCRYAMDY	49
H119F-L7	H119F	L7	H鎖	CDR-H3	DCFYAMDY	50
H48S-L7	H48S	L7	H鎖	FR1	DVQLQESGPGLVKPSSETLSLTC TVSGFSIS	51
H71Y-L7	H71Y	L7	H鎖	CDR-H2	YTYSGITYYNPSLAS	52
H72A-L7	H72A	L7	H鎖	CDR-H2	YTFASGITYYNPSLAS	53
H72L-L7	H72L	L7	H鎖	CDR-H2	YTFLSGITYYNPSLAS	54
H72N-L7	H72N	L7	H鎖	CDR-H2	YTFNSGITYYNPSLAS	55
H72T-L7	H72T	L7	H鎖	CDR-H2	YTF ~~T~~ SGITYYNPSLAS	56
H72W-L7	H72W	L7	H鎖	CDR-H2	YTFWSGITYYNPSLAS	57
H75H-L7	H75H	L7	H鎖	CDR-H2	YTFYSGHTYYNPSLAS	58
H75L-L7	H75L	L7	H鎖	CDR-H2	YTFYSGLYYYNPSLAS	59
H75N-L7	H75N	L7	H鎖	CDR-H2	YTFYSGNTYYNPSLAS	60
H75Q-L7	H75Q	L7	H鎖	CDR-H2	YTFYSGQTYYNPSLAS	61
H79H-L7	H79H	L7	H鎖	CDR-H2	YTFYSGITYYHPSLAS	62
H79K-L7	H79K	L7	H鎖	CDR-H2	YTFYSGITYYKPSLAS	63
H79Q-L7	H79Q	L7	H鎖	CDR-H2	YTFYSGITYYQPSLAS	64
H79R-L7	H79R	L7	H鎖	CDR-H2	YTFYSGITYYRPSLAS	65
H83R-L7	H83R	L7	H鎖	CDR-H2	YTFYSGITYYNPSLR	66

[表13-2]

抗体名	配列名		変異場所		配列	配列番号
	H鎖	L鎖	鎖	領域		
H117Q-L7	H117Q	L7	H鎖	CDR-H3	QC <u>D</u> YAMDY	67
H119E-L7	H119E	L7	H鎖	CDR-H3	DC <u>E</u> YAMDY	68
H119H-L7	H119H	L7	H鎖	CDR-H3	DC <u>H</u> YAMDY	69
H119K-L7	H119K	L7	H鎖	CDR-H3	DC <u>K</u> YAMDY	70
H119N-L7	H119N	L7	H鎖	CDR-H3	DC <u>N</u> YAMDY	71
H119Q-L7	H119Q	L7	H鎖	CDR-H3	DC <u>Q</u> YAMDY	72
H119S-L7	H119S	L7	H鎖	CDR-H3	DC <u>S</u> YAMDY	73
H119T-L7	H119T	L7	H鎖	CDR-H3	DC <u>T</u> YAMDY	74
H120A-L7	H120A	L7	H鎖	CDR-H3	DCD <u>A</u> AMDY	75
H120D-L7	H120D	L7	H鎖	CDR-H3	DCD <u>D</u> AMDY	76
H120F-L7	H120F	L7	H鎖	CDR-H3	DCD <u>F</u> AMDY	77
H120N-L7	H120N	L7	H鎖	CDR-H3	DCD <u>N</u> AMDY	78
H120Q-L7	H120Q	L7	H鎖	CDR-H3	DCD <u>Q</u> AMDY	79
H122F-L7	H122F	L7	H鎖	CDR-H3	DCDY <u>F</u> DY	80
H3-L47R	H3delK	L47R	L鎖	CDR-L1	RAS <u>R</u> DISNYLN	81
H3-L48E	H3delK	L48E	L鎖	CDR-L1	RASQ <u>E</u> ISNYLN	82
H3-L48R	H3delK	L48R	L鎖	CDR-L1	RASQ <u>R</u> ISNYLN	83
H3-L48S	H3delK	L48S	L鎖	CDR-L1	RASQ <u>S</u> ISNYLN	84
H3-L48K	H3delK	L48K	L鎖	CDR-L1	RASQ <u>K</u> ISNYLN	85
H3-L50D	H3delK	L50D	L鎖	CDR-L1	RASQD <u>I</u> DNYLN	86
H3-L50R	H3delK	L50R	L鎖	CDR-L1	RASQD <u>I</u> RNYLN	87
H3-L50F	H3delK	L50F	L鎖	CDR-L1	RASQD <u>I</u> FNYLN	88
H3-L50Y	H3delK	L50Y	L鎖	CDR-L1	RASQD <u>I</u> YNYLN	89
H3-L73R	H3delK	L73R	L鎖	CDR-L2	YTS <u>R</u> LHS	90
H3-L111F	H3delK	L111F	L鎖	CDR-L3	QQ <u>F</u> NTPWT	91
H3-L111Y	H3delK	L111Y	L鎖	CDR-L3	QQ <u>Y</u> NTPWT	92
H3-L112E	H3delK	L112E	L鎖	CDR-L3	QQG <u>E</u> TLPWT	93
H3-L112R	H3delK	L112R	L鎖	CDR-L3	QQG <u>R</u> TLPWT	94
H3-L112D	H3delK	L112D	L鎖	CDR-L3	QQG <u>D</u> TLPWT	95
H3-L112F	H3delK	L112F	L鎖	CDR-L3	QQG <u>F</u> TLPWT	96
H3-L113D	H3delK	L113D	L鎖	CDR-L3	QQG <u>N</u> DLPWT	97
H3-L113R	H3delK	L113R	L鎖	CDR-L3	QQG <u>N</u> RLPWT	98
H3-L113F	H3delK	L113F	L鎖	CDR-L3	QQG <u>N</u> FLPWT	99
H3-L48H	H3delK	L48H	L鎖	CDR-L1	RASQ <u>H</u> ISNYLN	100
H3-L48Y	H3delK	L48Y	L鎖	CDR-L1	RASQ <u>Y</u> ISNYLN	101
H3-L50Q	H3delK	L50Q	L鎖	CDR-L1	RASQD <u>I</u> QNYLN	102
H3-L50W	H3delK	L50W	L鎖	CDR-L1	RASQD <u>I</u> WNYLN	103
H3-L51Q	H3delK	L51Q	L鎖	CDR-L1	RASQD <u>I</u> SQYLN	104

[表13-3]

抗体名	配列名		変異場所		配列	配列番号
	H鎖	L鎖	鎖	領域		
H3-L69Y	H3delK	L69Y	L鎖	FR2	WYQQKPGKAVKLLI <u>Y</u>	105
H3-L70F	H3delK	L70F	L鎖	CDR-L2	<u>F</u> TSTLHS	106
H3-L70H	H3delK	L70H	L鎖	CDR-L2	<u>H</u> TSTLHS	107
H3-L72D	H3delK	L72D	L鎖	CDR-L2	Y <u>D</u> TLSH	108
H3-L72E	H3delK	L72E	L鎖	CDR-L2	Y <u>E</u> TLSH	109
H3-L72R	H3delK	L72R	L鎖	CDR-L2	Y <u>R</u> TLSH	110
H3-L72Y	H3delK	L72Y	L鎖	CDR-L2	Y <u>Y</u> TLSH	111
H3-L73K	H3delK	L73K	L鎖	CDR-L2	YTS <u>K</u> LHS	112
H3-L73N	H3delK	L73N	L鎖	CDR-L2	YTS <u>N</u> LHS	113
H3-L73Y	H3delK	L73Y	L鎖	CDR-L2	YTS <u>Y</u> LHS	114
H3-L75Q	H3delK	L75Q	L鎖	CDR-L2	YTSTL <u>Q</u> S	115
H3-L87K	H3delK	L87K	L鎖	FR3	GVPSRFGSGSG <u>K</u> GTDYTLTISSL QPEDFATYFC	116
H3-L87N	H3delK	L87N	L鎖	FR3	GVPSRFGSGSG <u>N</u> GTDYTLTISSL QPEDFATYFC	117
H3-L111A	H3delK	L111A	L鎖	CDR-L3	QQ <u>A</u> NTPWT	118
H3-L111N	H3delK	L111N	L鎖	CDR-L3	QQ <u>N</u> NTPWT	119
H3-L111S	H3delK	L111S	L鎖	CDR-L3	QQ <u>S</u> NTPWT	120
H3-L112H	H3delK	L112H	L鎖	CDR-L3	QQ <u>H</u> TLPWT	121
H3-L112Q	H3delK	L112Q	L鎖	CDR-L3	QQ <u>Q</u> TLPWT	122
H3-L112T	H3delK	L112T	L鎖	CDR-L3	QQ <u>T</u> TLPWT	123
H3-L112Y	H3delK	L112Y	L鎖	CDR-L3	QQ <u>Y</u> TLPWT	124
H3-L113S	H3delK	L113S	L鎖	CDR-L3	QQG <u>N</u> SLPWT	125
H3-L114F	H3delK	L114F	L鎖	CDR-L3	QQGNT <u>F</u> PWT	126
H3-L114H	H3delK	L114H	L鎖	CDR-L3	QQGNT <u>H</u> PWT	127
H3-L114I	H3delK	L114I	L鎖	CDR-L3	QQGNT <u>I</u> PWT	128
H3-L114N	H3delK	L114N	L鎖	CDR-L3	QQGNT <u>N</u> PWT	129
H3-L114Y	H3delK	L114Y	L鎖	CDR-L3	QQGNT <u>Y</u> PWT	130
H3-L116H	H3delK	L116H	L鎖	CDR-L3	QQGNTLP <u>H</u> T	131
H3-L116Y	H3delK	L116Y	L鎖	CDR-L3	QQGNTLP <u>Y</u> T	132

[0141] II. 薬理試験 (1)

A. 血中hGDF15の捕捉

1 試験材料および方法

動物

1) 種/系統: mouse/ BALB-c Slc-nu/nu

- 2) 微生物学的グレード：specific pathogen-free (SPF)
- 3) 入手先：日本エスエルシー
- 4) 性：雌
- 5) 週齢：6週齢（hGDF15、抗体投与時）
- 6) 飼育条件
 下記の条件に設定された環境下で、動物の飼育を行う。
 a) 温度：23±2℃
 b) 湿度：60±10%
 c) 照明：照明時間：午前7時～午後7時
 消灯時間：午後7時～午前7時
 d) 餌及び水：自由摂取、CRF-1（オリエンタル酵母(株)）、

水道水

[0142] 試験スケジュール

表14に抗体投与日を0日とした試験スケジュールを示す。

[表14]

項目	抗体投与日を0日とした日数（●は実施日）				
	-2	0	1	2	3
群分け	●				
rhGDF15投与		●	●	●	●
抗体投与		●			
体重・摂餌量	●	●	●	●	●
採血					●

[0143] 動物の飼育方法

搬入日から3日後にマウスを個別のケージに分けた。個別飼育に対する馴化のため、群分けまでの馴化期間を5日間とした。

[0144] 群分け

体重をもとに、1群6匹ずつ、計6群に実験データ収集処理システム（SAS institute Japan、R9.3）にて群分けを行った。

[0145] 抗hGDF15抗体の投与

rhGDF15、HuMAB2抗体、およびMAB17抗体は、10 mL/kgで腹腔内投与した。
対照群にはDulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)を10 mL/kgで投与した。群構成を表15に示す。

[表15]

	処置	例数
1	DPBS	6
2	rhGDF15 0.3 mg/kg	6
3	rhGDF15 1 mg/kg	6
4	rhGDF15 3 mg/kg	6
5	rhGDF15 3 mg/kg + MAB17 3 mg/kg	6
6	rhGDF15 3 mg/kg + HuMAB2 3 mg/kg	6

[0146] 体重及び摂餌量の測定

体重及び摂餌量は、群分け日と投与0日、1日、2日、3日後に測定を行った。

[0147] 採血・解剖

採血は、抗体投与後3日目に、イソフルラン吸入で麻酔したマウスの下大静脈より行った。EDTA2Kの採血管を用いて血漿とし、使用まで-80℃設定の冷凍庫で保存した。採血後のマウスは、麻酔下のまま腹部下大静脈切開により放血安楽死させた。

[0148] 血中非結合hGDF15濃度

血中の抗体に結合していないhGDF15（非結合hGDF15）を測定するために、抗原抗体複合体を以下の手順で除去した。5 μ L Protein A/G agarose beads（Thermo scientific、20421）と、50 μ Lのマウス血漿および145 μ LのPBSとを混合し、4℃で2時間混和した。遠心分離後、上清を新しいエッペンチューブに移して、使用まで-80℃設定の冷凍庫で保存した。その後の血中GDF15測定は、GDF15測定ELISAキット（R&D systems、DY957）を使用し、手順はキットの説明書に準じた。検出限界以下の検体に関しては血中GDF15濃度を0 pg/mLとした。

[0149] 統計解析方法

血中非結合GDF15濃度に関しては、ウィルコクソンの順位和検定を行った。

統計解析にはSAS software (SAS institute Japan、R9.3)を使用した。

[0150] 2 結果

結果を図6に示す。hGDF15の血中濃度はrhGDF15の投与量に依存して増加し、MAB17およびHuMAB2ともに血中のGDF15を捕捉した。

[0151] B. 担癌マウスモデルの血中GDF15濃度の減少

1 試験材料および方法

被験物質

- ・ HuMAB2
- ・ MAB1
- ・ MAB13

対照物質

- ・ MAB17
- ・ MAB957 (R&D Systems)
- ・ Hu01G06-127 (W02014/100689)

[0152] 被験物質および対照物質の調製

すべての抗体をDPBSで1 mg/mLに調製し、投与日まで-80℃設定の冷凍庫に保存した。

[0153] 試験系

細胞

- 1) 細胞株名 : MKN45
- 2) 由来 : ヒト胃がん
- 3) 入手先 : JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) cell bank
- 4) 培養条件 : 37℃、5% CO₂
 - a) 培養液 : RPMI1640
 - i) 入手先 : life technologies
- b) 血清 : Fetal bovine serum
- i) 濃度 : 10%

ii) 入手先 : Tissue Culture Biology

動物

5) 種/系統 : mouse/ BALB-c Slc-nu/nu

6) 微生物学的グレード : specific pathogen-free (SPF)

7) 入手先 : 日本エスエルシー

8) 性 : 雌

9) 週齢 : 7週齢 (細胞移植時)

10) 前記「A. 血中hGDF15の捕捉」に記載の環境下で、動物の飼育を行った。

[0154] 群構成

[表16]

試験1				
	群名	細胞移植	投与物質 (用量)	例数
1	Normal (vehicle)	なし	DPBS	5
2	MKN45 (vehicle)	MKN45	DPBS	5
3	MKN45 (MAB17)	MKN45	MAB17 (10 mg/kg)	5
4	MKN45 (MAB957 ¹⁾)	MKN45	MAB957 (10 mg/kg)	5
5	MKN45 (Hu01G06-127 ²⁾)	MKN45	Hu01G06-127 (10 mg/kg)	5
6	MKN45 (HuMAB2)	MKN45	HuMAB2 (10 mg/kg)	5

1) R&D Systems、MAB957、Lot No: UDC1014011

2) ヒト化抗hGDF15抗体 (W02014/100689)

[表17]

試験2				
	群名	細胞移植	投与物質 (用量)	例数
1	Normal (vehicle)	なし	DPBS	5
2	MKN45 (vehicle)	MKN45	DPBS	5
3	MKN45 (MAB17)	MKN45	MAB17 (10 mg/kg)	5
4	MKN45 (MAB1)	MKN45	MAB1 (10 mg/kg)	5
5	MKN45 (MAB13)	MKN45	MAB13 (10 mg/kg)	5

[0155] 試験方法

動物の飼育方法

搬入日から3日後にマウスを個別のケージに分けた。個別飼育に対する馴化

のため、MKN45を移植するまでの馴化期間を5日間とした。

[0156] 細胞の調製と動物への細胞移植

MKN45細胞は150 mmのシャーレで培養し、移植日に0.25%トリプシン-EDTA (SIGMA、T6689) 処理にて細胞を回収し、遠心分離 (1200rpm、5分) により上清を除去した。DPBSにて 5×10^6 cells/mLになるように懸濁し、イソフルラン吸入で麻酔したマウスの腹部皮下に0.2 mL/body (1×10^6 cells/body) で移植した。

[0157] 群分け

試験1では、MKN45移植前に、42匹のマウスよりランダムに5匹を選び、Normal(vehicle)群とし、残り37匹にMKN45を移植した。MKN45移植から12日後に体重をもとに、1群5匹ずつ、計6群にSAS software (SAS institute Japan, R9.4) にて群分けを行い、MKN45(vehicle)群、MKN45(MAB17)群、MKN45(MAB957)群、MKN45(Hu01G06-127)群、およびMKN45(HuMAB2)群に割り当てた。同様にして、試験2でも、Normal(vehicle)群、MKN45(vehicle)群、MKN45(MAB17)群、MKN45(MAB1)群、およびMKN45(13)群に、1群5匹ずつ割り当てた。群分け後、余剰動物はイソフルラン麻酔下で放血安楽死させた。

[0158] DPBSおよび抗体の投与

MKN45移植から14日後 (群分けから2日後) に、DPBSおよび抗体 (10 mL/kg) を腹腔内投与した。試験1では、抗体投与開始後7日目にもDPBSおよび抗体を投与した。

[0159] 採血

採血は、抗体投与開始後14日目 (試験1) または7日後 (試験2) に、イソフルラン吸入で麻酔したマウスの下大静脈より行った。EDTA2Kの採血管を用いて血漿とし、使用まで-80℃設定の冷凍庫で保存した。採血後のマウスは、麻酔下のまま腹部下大静脈切開により放血安楽死させた。

[0160] 血中非結合hGDF15濃度

血中の抗体に結合していないhGDF15 (非結合hGDF15) を測定するために、抗原抗体複合体を以下の手順で除去した。5 μ L Protein A/G agarose beads

(Thermo scientific、20421) と50 μ Lのマウス血漿、145 μ LのPBSを混合し、4℃で2時間混和した。遠心分離後、上清を新しいエッペンチューブに移して、使用まで-80℃設定の冷凍庫で保存した。その後の血中GDF15測定は、GDF15測定ELISAキット (R&D systems、DY957) を使用し、手順はキットの説明書に準じた。検出限界以下 (62.5 pg/mL以下) の検体に関しては血中GDF15濃度を0 pg/mLとした。

[0161] 統計解析方法

抗体投与開始から14日目 (試験1) または7日後 (試験2) の血中非結合hGDF15濃度に対して、ウィルコクソンの順位和検定を行った。統計解析にはSAS software (SAS institute Japan、R9.4) を使用した。

[0162] 2 結果

試験1において、MKN45細胞を移植したMKN45群の血中hGDF15濃度は、約2000 pg/mLであった。MKN45細胞を移植したモデルマウスに抗体を投与した群では、MAB17、MAB957、Hu01G06-127抗体投与群では、溶媒投与群に比べ血中hGDF15濃度の上昇が観察された。一方、HuMAB2投与群では、血中hGDF15濃度は減少していた (図7)。

[0163] 試験2において、溶媒投与群の血中hGDF15濃度を100とした場合の相対値を表18に示す。HuMAB2と同様に、MAB1およびMAB13によっても、血中hGDF15濃度の減少が観察された。

[表18]

群名	血中GDF15量の相対値
MKN45 (vehicle)	100
MKN45 (MAB17)	302.6
MKN45 (MAB1)	72.1
MKN45 (MAB13)	85.8

[0164] 上記の結果は、リコンビナントhGDF15を投与した試験 (図6) でのMAB17の結果とは異なるものであった。この原因の一つとして、HuMAB2と試験に用いた他の3つの抗体とのエピトープの違いがあげられる。hGDF15は、プロhGDF15がタンパク質分解酵素により切断されることで産生される (A.R. Bauson et al)

l. Cancer Res. 2005; 65 (6):2320-2336)。HuMAB2は、この切断部位の近傍にエピトープが存在し、ここに結合することで、hGDF15の産生を抑制している可能性が考えられた。これまでに、ある抗CCL-2中和抗体（ABN912）がリウマチ患者の病態を改善せずに悪化させたことが報告されており、抗体の用量依存的に血中CCL-2濃度が上昇したことがこの悪化の原因の一つと考えられたことから、血中抗原濃度を減少させることの重要性が示唆されてきた（J. J. Har- ingman et al. Arthritis & Rheumatism 2006;54 (8):2387-2392）。このよ- うなことから、HuMAB2のような血中GDF15量を減少させる抗GDF15抗体は、血中hGDF15を増加させる抗体よりも臨床上有用であることが期待される。

[0165] C. 担癌マウスモデルの悪液質症状の改善 (1)

1 試験材料および方法

1.1 被験物質の調製

HuMAB2をDPBSで1 mg/mLに調製し、投与日まで-80℃設定の冷凍庫に保存した。

[0166] 1.2 試験系

1.2.1 細胞

1) 細胞株名：MKN45

2) 由来：ヒト胃がん

3) 入手先：JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) cell bank

4) 培養条件：37℃、5% CO₂

a) 培養液：RPMI 1640

i) 入手先：life technologies

b) 血清：Fetal bovine serum

i) 濃度：10%

ii) 入手先：Tissue Culture Biology

1.2.2 動物

1) 種/系統：mouse/ BALB-c Slc-nu/nu

- 2) 微生物学的グレード：specific pathogen-free (SPF)
- 3) 入手先：日本エスエルシー
- 4) 性：雌
- 5) 週齢：7週齢（細胞移植時）
- 6) 飼育条件

下記の条件に設定された環境下で、動物の飼育を行う。

- a) 温度：23 ± 2℃
- b) 湿度：60 ± 10%
- c) 照明：照明時間：午前7時 ～ 午後7時
消灯時間：午後7時 ～ 午前7時
- d) 餌及び水：自由摂取、CRF-1（オリエンタル酵母(株)）、水道水

[0167] 1.2.3 群構成

[表19]

	群名	細胞移植	投与物質（用量）	例数
1	Normal (vehicle)	なし	DPBS	8
2	MKN45 (vehicle)	MKN45	DPBS	8
3	MKN45 (HuMAB2)	MKN45	HuMAB2 (10 mg/kg)	8

[0168] 1.3 試験方法

1.3.1 試験スケジュール

表20に抗体投与日を0日とした試験スケジュールを示す。

[表20]

項目	抗体投与日を0日とした日数（●は実施日）								
	-14	-11	-8	-5	-2	0	2	4	7
MKN45 移植	●								
群分け					●				
抗体投与						●			
体重・摂餌量	●	●	●	●	●	●	●	●	●
採血・解剖									●

[0169] 1.3.2 動物の飼育方法

搬入日から3日後にマウスを個別のケージに分けた。個別飼育に対する馴化のため、MKN45移植するまでの馴化期間を5日間とした。

[0170] 1.3.3 細胞の調製と動物への細胞移植

MKN45細胞は150 mmのシャーレで培養し、移植日に0.25%トリプシン-EDTA (SIGMA、T6689) 処理にて細胞を回収し、遠心分離 (1200rpm、5分) により上清を除去した。DPBSにて 5×10^6 cells/mL になるように懸濁し、イソフルラン吸入で麻酔したマウスの腹部皮下に0.2 mL/body (1×10^6 cells/body) で移植した。

[0171] 1.3.4 群分け

MKN45移植前に、32匹のマウスよりランダムに8匹を選び、Normal群とし、残り24匹にMKN45を移植した。MKN45移植から12日後に体重をもとに、1群8匹ずつ、計2群に実験データ収集処理システム (EDCS、ver.2.1) にて群分けを行い、MKN45群とHuMAB2群に割り当てた。群分け後、余剰動物はイソフルラン麻酔下で放血安楽死させた。

[0172] 1.3.5 DPBSおよびHuMAB2の投与

MKN45移植から14日後 (群分けから2日後) にDPBSおよびHuMAB2を投与した。DPBSおよびHuMAB2は10 mL/kgで腹腔内投与した。

[0173] 1.3.6 体重及び摂餌量の測定

体重及び摂餌量は、MKN45移植日から抗体投与日まで3日毎に測定した。抗体投与日からは投与0日、2日、4日、7日後に測定を行った。

[0174] 1.3.7 採血・解剖

採血は、抗体投与後7日目に、イソフルラン吸入で麻酔したマウスの下大静脈より行った。EDTA2Kの採血管を用いて血漿とし、使用まで-80℃設定の冷凍庫で保存した。採血後のマウスは、麻酔下のまま腹部下大静脈切開により放血安楽死させた。腫瘍は、腫瘍部の皮膚を切開し、手術用ハサミを用いて採取して、重量を測定した。

[0175] 1.4 統計解析方法

抗体投与7日後の体重および腫瘍重量、抗体投与日から7日目までの累積摂

餌量に関しては、Normal群とMKN45群、MKN45群とHuMAB2群のそれぞれに対し対応のないt検定を行った。血中非結合GDF15濃度に関しては、ウィルコクソンの順位和検定を行った。統計解析にはSAS software (SAS institute Japan、R9.3)を使用した。

[0176] 2 結果

担癌（MKN45細胞移植）マウスを用いて、がん性悪液質の症状である体重および摂餌量の変化に対するHuMAB2の効果を検討し、血中非結合GDF15量への影響も検討した。図8に体重の推移と、抗体投与後7日間の累積摂餌量、抗体投与7日後の血中非結合GDF15濃度を示す。抗体投与7日後の体重はNormal群と比較して、MKN45群は4 g程度減少し、MKN45細胞の移植により有意な体重減少が認められた ($P<0.01$)。一方、HuMAB2群では抗体の投与後に体重減少の回復が観察され、MKN45群と比較して有意な体重の増加が認められた ($P<0.01$)。同様に抗体投与後7日間の累積摂餌量に関しても、MKN45群では有意に減少し ($P<0.01$)、HuMAB2群ではMKN45群と比較して有意な増大が認められた ($P<0.01$)。血中非結合GDF15濃度は、Normal群では検出されなかったが、MKN45群で1500 pg/mL程度まで有意に上昇し ($P<0.01$)、図7の結果と同様に、HuMAB2群では20分の1程度にまで有意に減少していた ($P<0.01$)。これらの結果から、MKN45移植マウスの悪液質様症状（体重減少、摂餌量）はHuMAB2の投与によって回復する事が確認できた。

[0177] D. 担癌マウスモデルの悪液質症状の改善 (2)

1 試験材料および方法

1.1 被験物質の調製

HuMAB2をDPBSで1 mg/mLに調製し、投与日まで -80°C 設定の冷凍庫に保存した。

[0178] 1.2 試験系

1.2.1 細胞

1) 細胞株名：MKN45

1) 由来：ヒト（ヒト胃がん組織）

- 2) 入手先 : JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources)
- 3) 培養条件 : 37℃ 5% CO₂ 前培養条件 : 37℃ 5% CO₂
- a) 培養液 : RPMI1640
- i) 入手先 : life technologies
- b) 血清 : Fetal bovine serum
- i) 濃度 : 10%
- ii) 入手先 : Tissue Culture Biology

1.2.2 動物

- 1) 種/系統 : マウス/ BALB-c Slc-nu/nu
- 2) 微生物学的グレード : specific pathogen-free (SPF)
- 3) 入手先 : 日本エスエルシー
- 4) 性 : 雌
- 5) 週齢 : 6-12週齢
- 6) 飼育条件

下記の条件に設定された環境下で、動物の飼育を行った。

- a) 温度 : 23 ± 2℃
- b) 湿度 : 60 ± 10%
- c) 照明 : 照明時間 : 午前7時 ~ 午後7時
消灯時間 : 午後7時 ~ 午前7時
- d) 餌及び水 : 自由摂取 (試験1のPair-feeding群は毎日規定量を給餌)、CRF-1 (オリエンタル酵母(株))、水道水

[0179] 1.2.3 群構成

[表21]

	群名	細胞移植	投与物質 (用量)	例数
1	Normal (vehicle)	なし	DPBS	5
2	MKN45 (vehicle)	MKN45	DPBS	4
3	MKN45 (HuMAB2)	MKN45	HuMAB2 (10 mg/kg)	4

[0180] 1.3 試験方法

1.3.1 モデルの作製・群分け・抗体の投与

まず、Normal群として5匹をランダムに選び出した。悪液質モデル作製は上記Cに記載のとおり行い、抗体は腹腔内投与した（図9）。

[0181] 1.3.2 自発運動量の測定

自発運動量の測定は、ケージ内にワイヤレスランニングホイール（ブレインサイエンスイデア社、ENV-044）を設置して、ランニングホイールの回転数を自発運動量として測定した。測定値は明期（午前7時から午後7時まで）と暗期（午後7時から午前7時まで）の12時間ごとに集計した。

[0182] 1.4 評価項目

- ・ 体重
- ・ 自発運動量

[0183] 1.5 統計解析方法

群分けに関しては、体重を指標とした次元で行った。群分けと検定に関してはSAS software (SAS institute Japan、R9.3) を使用した。

[0184] 2 結果

GDF15によって誘導される悪液質様症状を評価するために、ケージ内にランニングホイールを入れて自発運動量を測定した。図9に試験スケジュールを示す。Normal群に比べ、MKN45群では活動量が10分の1程度にまで減少していた。この活動量の減少は、HuMAB2投与後3日程度でほぼNormal群と同等程度に回復する事が明らかとなった。また、MKN45群では、活動量の減少だけでなく、活動パターンにも相違があることが判明した。Normal群では、暗期に活発になり、明期に活動性が低下する夜行性動物の特徴が観察されているが、MKN45群では、その活動パターンが明らかに逆転していた。そして、抗体を投与されたHuMAB2群では、そのパターンもNormal群と同様に回復していた。

[0185] III. 抗体作製 (2)

A. 配列決定

MAB1およびMAB13（表1）について、MAB2と同様にしてアミノ酸配列を決定した。H鎖およびL鎖可変領域のアミノ酸配列を表22に、CDR配列を表23に

示す。

[0186] [表22]

抗体名	配列名 (ペクター名)	アミノ酸配列 (下線部は CDR 配列)	配列 番号
MAB1	H 鎖可変領域	MSSPQSLKTLTITMGWTWIFILISVTTGVHSEVQLQQ SGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNVVKQSNKGS LEWIGNIDPYYGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQ LKSLTSEDSAVYYCARPGRYDGAWFAYWGQGTLLTVSA	133
	L 鎖可変領域	MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQSPAILSASPG EKVTMTCRASSNVNYMHWYQKPGSSPKPWIIATSNLA SGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSD NPLTFGAGTKLELK	134
MAB13	H 鎖可変領域	MSSPQSLKTLTMTGGIWIIFLLSGTAGVHSEIQLQQ TGPVLKPGASVKISCKASGYSFTDYIMLVVKQRHGKS LEWIGNIHPYYGTTSYNLKFKGKATLTVDKSSSTAYMQ LNSLTSEDSAVYYCARGIGGSPFAYWGQGTLLTVSA	135
	L 鎖可変領域	MKLPVRLVLMPFWIPASSSDVLMQTPLSLPVSLGDQA SISCRSSQSIHVSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS NRFSGVDPDRFTGTSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQ GSHVPYTFGGGTKLEIK	136

[0187] [表23]

抗体名	鎖	CDR 番号	配列	配列 番号
MAB1	H鎖	CDR-H1	GYNMN	137
	H鎖	CDR-H2	NIDPYYGGTSYNQKFKG	138
	H鎖	CDR-H3	PGRYDGAWFAY	139
	L鎖	CDR-L1	RASSNVNYMH	140
	L鎖	CDR-L2	ATSNLAS	141
	L鎖	CDR-L3	QQWSDNPLT	142
MAB13	H鎖	CDR-H1	DYIML	143
	H鎖	CDR-H2	NIHPYYGTTSYNLKFKG	144
	H鎖	CDR-H3	GIGGSPFAY	145
	L鎖	CDR-L1	RSSQSIHVSNGNTYLE	146
	L鎖	CDR-L2	KVSNRFS	147
	L鎖	CDR-L3	FQGSHVPYT	148

[0188] B. 変異抗体の作製

前記「I. 抗体作製 (1) G. CDR中のアミノ酸置換によるHuMAB2変異体のhG

DF15への結合」と同様にして、表 2 4 に示すさらなるHuMAB2変異体を作製した。HuMAB2のhGDF15への結合量を100とした際の各変異抗体の結合量を図 1 0 に示す。HuMAB2と同等以上の結合量を示す抗体が複数得られた。

[表24]

抗体名	配列名		変異場所		配列	配列番号
	H 鎖	L 鎖	鎖	領域		
H54T-L7	H54T	L7	H鎖	CDR-H1	SDCYW <u>T</u>	149
H54N-L7	H54N	L7	H鎖	CDR-H1	SDCYW <u>N</u>	150
H71R-L7	H71R	L7	H鎖	CDR-H2	YTR <u>Y</u> SGITYYNPSLAS	151
H71H-L7	H71H	L7	H鎖	CDR-H2	YTH <u>Y</u> SGITYYNPSLAS	152
H77I-L7	H77I	L7	H鎖	CDR-H2	YTI <u>Y</u> SGITYYNPSLAS	153
H3-L51Y	H3	L51Y	L鎖	CDR-L1	RASQDIS <u>Y</u> YLN	154
H3-L72F	H3	L72F	L鎖	CDR-L2	YTF <u>T</u> LHS	155
H3-L73Q	H3	L73Q	L鎖	CDR-L2	YTSQ <u>L</u> LHS	156
H3-L74H	H3	L74H	L鎖	CDR-L2	YTSTH <u>H</u> S	157

[0189] さらに、hGDF15への結合力の高かったHuMAB2変異体のH鎖（H49R、H49D、H48S、H71Y、H83R、またはH120F）およびL鎖（L48K、L112D、L72F、またはL74H）（表 2 5）を組み合わせ、得られた抗体のhGDF15との結合を調べた。結果を図 1 1 に示す。HuMAB2と同等以上の結合量を示す多数の抗体が得られた。

[表25]

配列名	変異場所		配列	配列番号
	鎖	領域		
H49R	H鎖	CDR-H1	RDCYW <u>I</u>	38
H49D	H鎖	CDR-H1	DDCYW <u>I</u>	39
H48S	H鎖	FR1	DVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFS <u>I</u> S	51
H71Y	H鎖	CDR-H2	YTY <u>Y</u> SGITYYNPSLAS	52
H83R	H鎖	CDR-H2	YTFYSGITYYNPSL <u>R</u> S	66
H120F	H鎖	CDR-H3	DCD <u>F</u> AMDY	77
L48K	L鎖	CDR-L1	RASQ <u>K</u> ISNYLN	85
L112D	L鎖	CDR-L3	QQGD <u>T</u> LPWT	95
L72F	L鎖	CDR-L2	YTF <u>T</u> LHS	155
L74H	L鎖	CDR-L2	YTSTH <u>H</u> S	157

[0190] C. GDF15、GFRALおよびRET複合体形成に対する阻害活性評価

GDF15は、受容体であるGFRALおよび共受容体であるRETと複合体を形成し、細胞内シグナルを伝達する。そこで、HuMAB2のGDF15、GFRALおよびRET複合体形成における影響を検討した。

[0191] はじめに、GDF15とGFRALとの複合体形成に対する影響を検討した（図12）。GFRAL（R&D systems, 9697-GR）を固相化したプレートへ、EZ-Link Micro NHS-PEG4-Biotinylation Kit（Thermo Fisher Scientific, 21955）を用いてビオチン化したGDF15（R&D Systems, 957-GD/CF）と、抗GDF15モノクローナル抗体（表26）の段階希釈液とを反応させた。ネガティブコントロール用抗体として、Human IgG1, kappa-Isotype Control（Abcam）を用いた。GFRALと結合したGDF15を、Pierce High Sensitivity Streptavidin-HRP（Thermo Fisher Scientific, 21130）を用いて検出した。発色にはTMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate, SureBlue（SeraCare Life Sciences）を用い、反応は停止液（Wako）を添加し停止した。吸光度は、Emax（Molecular Devices）を用いて450 nm（OD450）にて測定した。％ of control値は、抗体未添加時のOD450値をControlとして、各抗体添加時のOD450値から式-1を用いて算出した。IC50値は、得られた％ of control値から式-2を用いて阻害率を算出し、エクセルIC50算出マクロを用いて求めた。

$\% \text{ of control} = \text{抗体添加サンプルのOD450値} \div \text{抗体未添加時のOD450値} \times 100$ （式-1）

$\text{阻害率} = 100 - \% \text{ of control}$ （式-2）

[0192] 表26に示すように、HuMAB2を除く抗GDF15抗体はGDF15とGFRALとの複合体形成を阻害したが、HuMAB2は阻害しなかった。この違いはこれら抗体のエピトープの違いに基づくと考えられた。

[表26]

抗体	IC50 (nM)
HuMAB2	>500
Hu01G06-127 ¹⁾	0.05
MAB17	11.98
MAB957 ²⁾	11.13
Human IgG ³⁾ (Negative Control)	>500

1) ヒト化抗hGDF15抗体 (W02014/100689)

2) R&D Systems、MAB957、Lot No: UDC1014011

3) Human IgG1, kappa-Isotype Control (Abcam)

[0193] 次に、GDF15、GFRALおよびRETの複合体形成に対する影響を検討した。30 nM のGFRAL (R&D systems) を固相化したELISAプレートに、50 nM のGDF15 (R&D Systems, 9279-GD)、30 nM のRET (R&D Systems, 1168-CR) およびHuMAB2の段階希釈液 (0-500 nM) の混合液を添加した。ネガティブコントロール用抗体としてHuman IgG1, kappa-Isotype Control (Abcam) を用いた。形成されたGDF15/GFRAL/RET複合体をAnti-His Peroxidase conjugated antibody (R&D systems, MAB050H) を用いて検出した。発色にはTMB 1-Component Microwell Peroxidase Substrate, SureBlue (SeraCare Life Sciences) を用い、反応は停止液 (Wako) を添加し停止した。吸光度はEmax (Molecular Devices) を用いて450 nmにて測定した。% of control値は、抗体濃度 (0 nM) (抗体未添加時) のOD450値をControlとして、各抗体添加時のOD450値から式-1を用いて算出した。IC50値は、得られた% of control値から式-2を用いて阻害率を算出し、エクセルIC50算出マクロを用いて求めた。

[0194] HuMAB2は、GDF15/GFRAL複合体形成に対して阻害活性を示さなかったが (表26)、GDF15/GFRAL/RET複合体形成に対しては阻害活性を示した (図13)。これらの結果から、HuMAB2はシグナルを細胞内へ伝える機能を有するRETとの複合体形成を阻害することでGDF15の機能の阻害活性を発揮していると考えられた。

[0195] VI. 薬理試験 (2)

A. 担癌マウスモデルの悪液質症状の改善 (3)

前記「II. 薬理試験 (1) C. 担癌マウスモデルの悪液質症状の改善 (1)」と同様にして、担癌 (MKN45細胞移植) マウスを用いて、MAB1の体重、摂餌量、および血中非結合GDF15量への影響を検討した。群構成を表27に示す。

[表27]

	群名	細胞移植	投与物質 (用量)	例数
1	Normal (vehicle)	なし	DPBS	8
2	MKN45 (vehicle)	MKN45	DPBS	8
3	MKN45 (MAB17)	MKN45	MAB17 (10 mg/kg)	8
4	MKN45 (MAB1)	MKN45	MAB1 (10 mg/kg)	8

[0196] 図14に、体重の推移、抗体投与後7日間の累積摂餌量、および抗体投与7日後の血中非結合GDF15濃度を示す。MKN45群では体重減少が観察されるのに対し、MAB1群群では抗体の投与後に体重減少の回復が観察された。抗体投与後7日間の累積摂餌量も、MAB1群ではMKN45群と比較して増大する傾向が認められた。MKN45移植により増大する血中非結合GDF15濃度は、HuMAB2 (図8)と同様、MAB1により減少した。これらの結果から、MKN45移植マウスの悪液質様症状 (体重減少、摂餌量) はMAB1の投与によって回復する事が確認できた。